

INFORMATION TO USERS

This manuscript has been reproduced from the microfilm master. UMI films the text directly from the original or copy submitted. Thus, some thesis and dissertation copies are in typewriter face, while others may be from any type of computer printer.

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted. Broken or indistinct print, colored or poor quality illustrations and photographs, print bleedthrough, substandard margins, and improper alignment can adversely affect reproduction.

In the unlikely event that the author did not send UMI a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if unauthorized copyright material had to be removed, a note will indicate the deletion.

Oversize materials (e.g., maps, drawings, charts) are reproduced by sectioning the original, beginning at the upper left-hand corner and continuing from left to right in equal sections with small overlaps.

ProQuest Information and Learning
300 North Zeeb Road, Ann Arbor, MI 48106-1346 USA
800-521-0600

UMI[®]

Université de Sherbrooke

**Analyse de l'expression des homologues Bcl-2 au cours du
développement de l'intestin humain**

Par

Eric Cardin

Département d'Anatomie et de Biologie Cellulaire

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine

en vue de l'obtention du grade de

Maître ès Sciences (M.Sc.)

Février 2002



**National Library
of Canada**

**Acquisitions and
Bibliographic Services**

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

**Bibliothèque nationale
du Canada**

**Acquisitions et
services bibliographiques**

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

Our file Notre référence

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-74327-6

Canada

TABLES DES MATIÈRES

Titre.....	i
Tables de matières.....	ii
Liste des figures.....	vi
Liste des tableaux.....	viii
Liste des abréviations.....	ix
Liste des articles exposant ces travaux.....	x
Résumé.....	xi

I. INTRODUCTION

1.1	L'apoptose.....	1
1.2	Les homologues Bcl-2.....	2
1.2.1	La régulation des homologues Bcl-2.....	6
1.3	L'épithélium intestinal.....	11
1.3.1	Structure de l'épithélium intestinal.....	11
1.3.2	Développement de l'épithélium intestinal.....	16
1.3.3	Apoptose de l'épithélium intestinal.....	17
1.3.4	Les homologues Bcl2-2 de l'épithélium intestinal.....	18
1.3.4.1	Expression épithéliale des homologues Bcl-2.....	18
1.3.4.2	Importance des homologues Bcl-2 au niveau de.... l'épithélium intestinal.....	21

1.4	Hypothèse.....	22
1.5	Objectifs du projet de recherche.....	23

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1	Analyse de l'expression épithéliale des homologues Bcl-2 au cours du développement.....	24
2.1.1	Préparation des tissus.....	24
2.1.2	Immunofluorescence indirecte.....	25
2.2	Analyse des niveaux d'expression des homologues Bcl-2 par western blot.....	27
2.2.1	Préparation des tissus.....	28
2.2.2	Western blot.....	29
2.3	Les anticorps utilisés.....	31
2.3.1	Les anticorps polyclonaux de lapin.....	32
2.3.2	Les anticorps monoclonaux de souris.....	33

III. RÉSULTATS

3.1	Expression épithéliale des homologues Bcl-2 le long de l'axe crypte villosité au cours du développement du jéjunum, de l'iléon et du côlon foetal humain.....	36
-----	---	----

3.1.1	Expression épithéliale des homologues Bcl-2 chez le jéjunum, l'iléon et le côlon foetal humain de 9 à 14 semaines.....	37
3.1.2	Expression épithéliale des homologues Bcl-2 chez le jéjunum, l'iléon et le côlon foetal humain de 15 à 17 semaines.....	37
3.1.3	Expression épithéliale des homologues Bcl-2 du jéjunum, de l'iléon et du côlon foetal humain de 18 à 20 semaines..	40
3.2	Niveaux d'expression des homologues Bcl-2 chez le jéjunum, l'iléon et le côlon foetal humain au cours du développement.....	53
3.2.1	Niveaux d'expression des homologues Bcl-2 chez le jéjunum au cours du développement foetal humain (10-20 semaines).....	54
3.2.2	Niveaux d'expression des homologues Bcl-2 chez l'iléon au cours du développement foetal humain (12-20 semaines).	62
3.2.3	Niveaux d'expression des homologues Bcl-2 chez le côlon au cours du développement foetal humain (12-20 semaines).....	70
3.2.4	Variations segment-spécifiques de l'expression des homologues Bcl-2 au cours du développement de l'intestin humain.....	73

IV.	DISCUSSION.....	79
V.	REMERCIEMENTS.....	87
VI.	RÉFÉRENCES.....	88

LISTE DES FIGURES

Fig. 1	Les homologues Bcl-2 et leurs domaines d'homologie.....	3
Fig. 2	Interactions entre les homologues Bcl-2.....	8
Fig. 3	Organisation tridimensionnelle de l'épithélium du jéjunum et du côlon adulte.....	13
Fig. 4	Localisation épithéliale des homologues Bcl-2 chez le jéjunum humain entre 9 et 14 semaines de gestation.....	38
Fig. 5	Localisation épithéliale des homologues Bcl-2 chez le jéjunum humain entre 15 et 17 semaines de gestation.....	41
Fig. 6	Compartimentalisation épithéliale des homologues Bcl-2 chez le jéjunum humain à 18-20 semaines de gestation.....	44
Fig. 7	Compartimentalisation épithéliale des homologues Bcl-2 de l'iléon humain à 18-20 semaines de gestation	46
Fig. 8	Compartimentalisation épithéliale des homologues Bcl-2 du côlon humain à 18-20 semaines de gestation.....	49
Fig. 9	Compartimentalisation épithéliale des homologues Bcl-2 du jéjunum, de l'iléon et du côlon foetal humain à 18-20 semaines de gestation : schéma récapitulatif.....	51
Fig. 10	Niveaux d'expression des homologues Bcl-2 au cours du développement du jéjunum humain	55

Fig. 11	Niveaux d'expression relatifs des homologues Bcl-2 anti-apoptotiques au cours du développement du jéjunum foetal humain.....	58
Fig. 12	Niveaux d'expression relatifs des homologues Bcl-2 pro-apoptotiques au cours du développement du jéjunum foetal humain.....	60
Fig. 13	Niveaux d'expression des homologues Bcl-2 au cours du développement de l'iléon et du côlon humain.....	63
Fig. 14	Niveaux d'expression relatifs des homologues Bcl-2 anti-apoptotiques au cours du développement de l'iléon foetal humain	65
Fig. 15	Niveaux d'expression relatifs des homologues Bcl-2 pro-apoptotiques au cours du développement de l'iléon foetal humain.....	68
Fig. 16	Niveaux d'expression relatifs des homologues Bcl-2 anti-apoptotiques au cours du développement du côlon foetal humain	71
Fig. 17	Niveaux d'expression relatifs des homologues Bcl-2 pro-apoptotiques au cours du développement du côlon foetal humain.....	74
Fig. 18	Variations différentielles des niveaux d'expression des homologues Bcl-2 au cours du développement du jéjunum, de l'iléon et du côlon humain.....	76

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I	Immunofluorescence indirecte sur des coupes transversales de jéjunum, d'iléon et de côlon foetal humain.....	34
Tableau II	Immunobuvardage de type western fait à partir d'homogénats de jéjunum, d'iléon et de côlon foetal humain.....	35

LISTE DES ABRÉVIATIONS

CAD : Caspases Activated DNase

BH: Bcl-2 Homology Domaine

PBS: Phosphate Buffered Saline

OCT: Optimum Cutting Temperature Embedding Compound

Blotto: Lait en poudre sans matières grasses

FITC : Fluorescéine Isothio-Cyanate

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate

PAGE: Polyacrylamide Gel Electrophoresis

LISTE DES ARTICLES EXPOSANT CES TRAVAUX

Vachon PH, Cardin E, Harnois C, Reed JC, Vézina A, 2000. Early establishment of epithelial apoptosis in the developing human small intestine. *Int J Dev Biol* 44:891-898.

Vachon PH, Cardin E, Harnois C, Reed JC, Plourde A, Vézina A, 2001. Early acquisition of bowel segment-specific Bcl-2 homolog expression profiles during development of the human ileum and colon. *Histol Histopathol* 16:497-510.

ANALYSE DE L'EXPRESSION DES HOMOLOGUES BCL-2 AU COURS DU DÉVELOPPEMENT DE L'INTESTIN HUMAIN

par

Eric Cardin

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine en vue de l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M.Sc.), Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Qc, Février 2002.

RÉSUMÉ

Les homologues Bcl-2 constituent une famille de protéines structurellement apparentées qui jouent un rôle central dans la régulation de l'apoptose. Les mécanismes de régulation de l'apoptose entérocytaire sont peu connus. Afin de mieux comprendre cette régulation, le but de ce travail était d'analyser l'établissement des mécanismes de contrôles de l'apoptose entérocytaire au cours du développement de l'intestin humain. Pour ce faire nous avons étudié l'expression épithéliale des homologues Bcl-2 pro-apoptotiques (Bax, Bak et Bad) et anti-apoptotiques (Bcl-2, Mcl-1 et Bcl-X_L), ainsi que la molécule associée anti-apoptotique Bag-1, le long de l'axe crypte-villosité et pour les différents segments (jéjunum, iléon et côlon) de spécimens fœtaux humains âgés de 9 à 20 semaines de gestation. Dans un premier temps, afin d'analyser l'expression épithéliale des homologues Bcl-2 le long de l'axe crypte-villosité, nous avons effectué des immunofluorescences indirectes en utilisant des anticorps spécifiques pour les homologues étudiés. En observant les résultats de ces immunofluorescences chez le jéjunum, l'iléon et le côlon, on remarque que pour ces trois segments, des patrons d'expression le long de l'axe crypte-villosité s'établissent tôt au cours de la vie fœtale humaine et parallèlement au développement de la muqueuse intestinale. Cette compartimentalisation reflète des mécanismes de régulation qui sont spécifiques au stade de différenciation. On observe également que ces patrons d'expression sont différentiels entre le jéjunum, l'iléon et le côlon. Dans un deuxième temps, afin d'analyser l'expression épithéliale des homologues Bcl-2, nous avons effectué des Western blots. En analysant les résultats de ces Western blots chez le jéjunum, l'iléon et le côlon, on remarque que pour ces trois segments, les niveaux d'expression épithéliaux des homologues Bcl-2 varient au cours du développement. Ces variations semblent survenir en fonction de l'établissement de l'axe crypte-villosité et en réponse à la compartimentalisation observée. De plus, nos résultats montrent que l'expression des homologues Bcl-2 est modulée différemment au cours du développement de l'intestin, menant à l'établissement à la mi-gestation de profils d'expression épithéliaux des homologues Bcl-2 distincts entre les segments. Ceci renforce l'hypothèse que des différences dans l'expression des homologues Bcl-2 corréleront avec des mécanismes de contrôle de l'apoptose distincts pour les segments de l'intestin, hypothèse qui a été vérifiée dans notre laboratoire suite à ces travaux. Ces données mises ensemble suggèrent que

les mécanismes de contrôle de l'apoptose entérocytaire spécifiques aux segments sont acquis tôt durant l'âge foetal humain.

En conclusion, les observations faites ici apportent de nouvelles perspectives dans l'établissement des mécanismes de contrôle de l'apoptose entérocytaire spécifiques aux segments de l'intestin humain; où l'expression des homologues Bcl-2 est modulée différemment afin d'établir, à la migration, des patrons de localisation et d'expression épithéliales différents entre les segments de l'intestin.

Mots clés : apoptose, axe crypte-villosité, entérocyte, homologues Bcl-2, intestin.

I. INTRODUCTION

1.1 L'apoptose

L'apoptose (ou mort cellulaire programmée) est un processus essentiel au développement, au maintien et au renouvellement tissulaire (Que et Gores, 1996; Jacobson et al., 1997; Metcalfe et Streuli, 1997; Vaux et Korsmeyer, 1999). Ce processus suit une séquence d'événements bien définis (Kromer et al., 1995; Vaux et Strasser, 1996; Golstein, 1997; Wyllie, 1997) et peut être initié par divers agents tel que les virus, l'irradiation, les toxines, etc. (Cai et al., 1997; Staunton et Gaffrey, 1998). De plus, plusieurs hormones et facteurs de croissances stimulent ou suppriment l'apoptose via l'activation de voies de transduction de signal spécifiques à leurs récepteurs (Wyllie et al, 1980; Hale et al., 1996; Zushi et al., 1997). La perte de contact avec la matrice extracellulaire peut également être un facteur d'induction de l'apoptose et, dans ce cas, ce type d'apoptose est appelé anoïkose (Ruoslahti et Reed 1994; Sträter et al., 1996; Giancotti 1997; Shi et al., 1998). La régulation de l'apoptose est médiée par la famille des homologues Bcl-2 (Oltvai et Korsmeyer 1994; Reed et al., 1996a et 1996b; Adams et Cory, 1998). Une fois que la cellule est déterminée à entrer en apoptose, les caspases (protéases contenant des cystéines et clivant les sites aspartates) sont activées et clivent plusieurs substrats dans la cellule (Grossman et al., 1998). Les caspases sont les protéines effectrices de l'apoptose et sont responsables des caractéristiques morphologiques de

l'apoptose, dont le démantèlement du cytosquelette et la vacuolisation des membranes (Cohen, 1996). Les caspases sont également responsables de la fragmentation nucléaire via l'activation d'une endonucléase activée par les caspases (CAD) (Wyllie, 1998). Finalement, la cellule effectue une cytolysse douce et les débris cellulaires sont agrégés pour former les corps apoptotiques. Ceux-ci sont éliminés, sans provoquer une réaction inflammatoire, par phagocytose ou sont libérés dans une lumière comme c'est le cas pour l'intestin (Gavrieli et al., 1992; Moss et Holt, 1996; Wyllie, 1997).

1.2 Les homologues Bcl-2

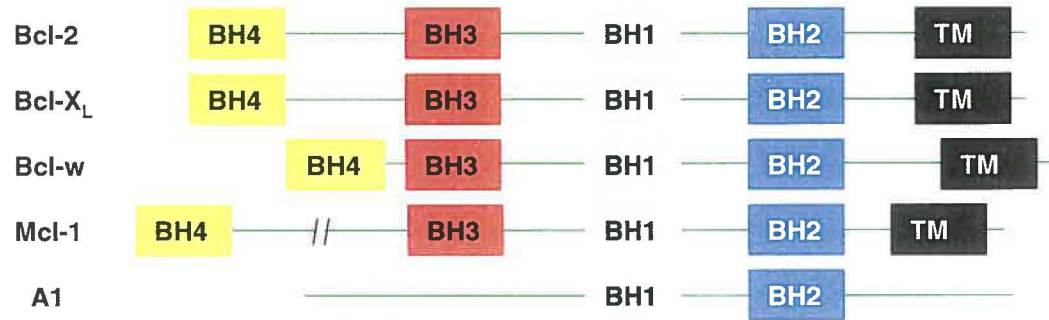
Les homologues Bcl-2 sont une famille de protéines structurellement apparentées possédant des domaines bien conservés appelés "domaine d'homologie Bcl-2" (BH). Ces domaines sont au nombre de quatre (BH1 à BH4) (figure 1). BH1 et BH2 sont impliqués dans la formation de pores et la survie, tandis que BH3 est impliqué dans l'activation de l'apoptose (Adams et Cory, 1998; Chao et Korsmeyer, 1998). BH1, BH2 et BH3, sont aussi impliqués dans les interactions entre homologues (Wang et Reed, 1998). Par exemple, Bad peut se lier à Bcl-2 via son domaine BH3 pour former un hétérodimère et ainsi promouvoir l'apoptose (Wang et Reed, 1998). Le domaine BH4, en N-terminal, se retrouve parmi les homologues Bcl-2 anti-apoptotiques (les homologues Bcl-2 qui régulent négativement l'enclenchement de l'apoptose) et est impliqué dans les interactions avec d'autres protéines qui ne sont pas des homologues comme par exemple la kinase Raf-1 (Wang et al., 1994; Zamzami

Figure 1. Les homologues Bcl-2 et leurs domaines d'homologie.

Les homologues sont divisés en trois sous classes ; la sous famille Bcl-2, qui promouvoit la survie, et les sous classes Bax et BH3, qui sont des activateurs d'apoptose. Les domaines BH1 à BH4 sont des domaines de séquences conservées. BH1 et BH2 sont responsables des interactions entre les homologues et de la formation de pores. BH3 est responsable des interactions entre les homologues et de la fonction pro-apoptotique. BH4 se trouve en N-terminal et est responsable des interactions avec des protéines non homologues. TM est une séquence C-terminale hydrophobe responsable de l'insertion aux membranes. Figure tirée et modifiée de (Chao et Korsmeyer, 1998).

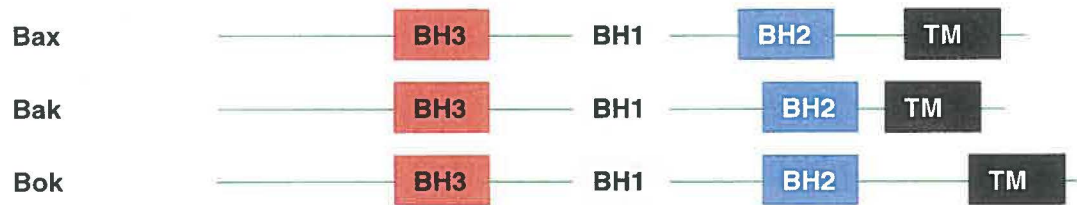
Anti-apoptotiques

(Sous classe Bcl-2)

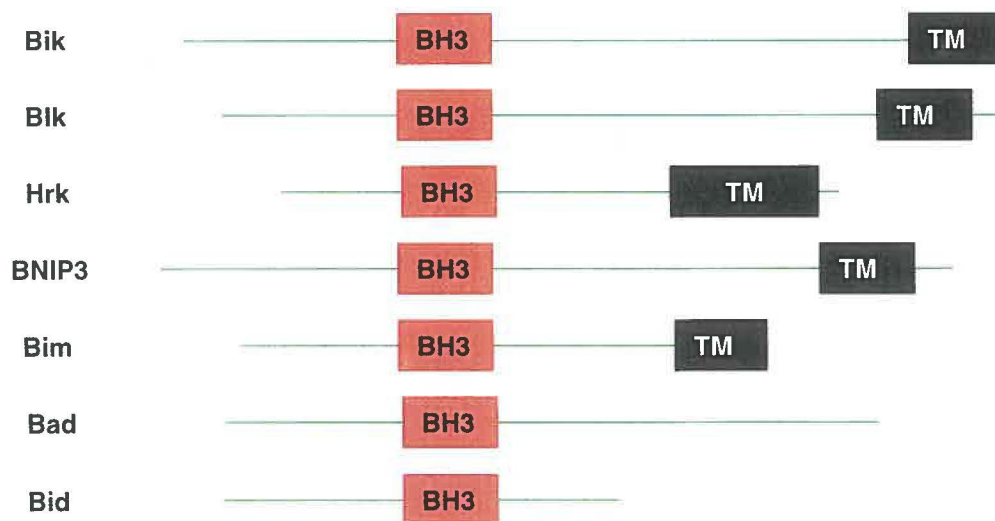


Pro-apoptotiques

(Sous classe Bax)



(Sous classe BH3)



et al., 1998) et Bag-1 (Takayama et al., 1995). Plusieurs homologues possèdent également un domaine C-terminal hydrophobe (TM) permettant l'insertion aux membranes. La famille des homologues Bcl-2 est habituellement divisée en deux groupes principaux selon leurs fonctions. Les anti-apoptotiques (tel que : Bcl-2, Mcl-1, Bcl-X_L) comprenant la sous classe des homologues semblables à Bcl-2 et les pro-apoptotiques (tel que : Bad, Bax, Bak) comprenant les sous classes d'homologues semblables à Bax et celles d'homologues à domaine BH3 (Figure1) (Hale et al., 1996; Adams et Cory, 1998; Chao et Korsmeyer, 1998).

Pour les anti-apoptotiques, Bcl-2 est le premier des homologues à avoir été découvert. Il possède tous les domaines d'homologie ainsi que la séquence C-terminale transmembranaire hydrophobe (TM) qui lui confère la capacité de se lier aux membranes (Figure 1). Bcl-X_L ressemble beaucoup à Bcl-2, il possède les quatre domaines BH et le domaine TM (Figure 1). Mcl-1, fait aussi partie de la sous famille Bcl-2 et possède également les quatre domaines BH ainsi que le domaine TM (Figure 1). Les homologues anti-apoptotiques Bcl-w et A1 sont également retrouvés chez les mammifères. Les deux possèdent les domaines BH1, BH2, BH4 et (TM) mais Bcl-w possède aussi le domaine BH3 (Figure 1). En plus des homologues Bcl-2 anti-apoptotiques, Bag-1 (Bcl-2 Binding Athanogene-1) est une protéine qui possède une activité anti-apoptotique et qui interagit avec Bcl-2 pour augmenter grandement ses capacités anti-apoptotiques (Takayama et al., 1995 et 1996).

Pour les homologues Bcl-2 pro-apoptotiques, Bad et Bid font partie de la sous classe BH3 et ne possèdent que le domaine BH3. Ils ne possèdent pas de domaine TM, et donc ne se lient pas aux membranes. Bax et Bak font partie de la sous classe Bax et possèdent les domaines BH1 à BH3 en plus du domaine TM. D'autres homologues pro-apoptotiques sont également retrouvés chez les mammifères: Bok, Bcl-X_S, Bik, Bid, Blk, Hrk, BNIP3, Bim (Boise et al., 1993; Adams et Cory, 1998; Chao et Korsmeyer, 1998; Inohara et al., 1998). Bcl-X_S, Bik, Blk, Hrk, BNIP3 et Bim possèdent le domaine BH3 et le domaine TM et Bcl-X_S possède de plus le domaine BH4. Il est important de noter que Bcl-X_S est une forme épissée de Bcl-X_L.

Chaque homologue Bcl-2, anti-apoptotique ou pro-apoptotique, possède des caractéristiques différentes, non seulement au niveau de leurs structures, mais aussi de leurs interactions avec les autres homologues Bcl-2 (Adams et Cory, 1998; Chao et Korsmeyer, 1998; Wang et Reed, 1998).

1.2.1 La régulation des homologues Bcl-2

La régulation des homologues Bcl-2 est complexe et au moins cinq types de régulation peuvent être impliqués:

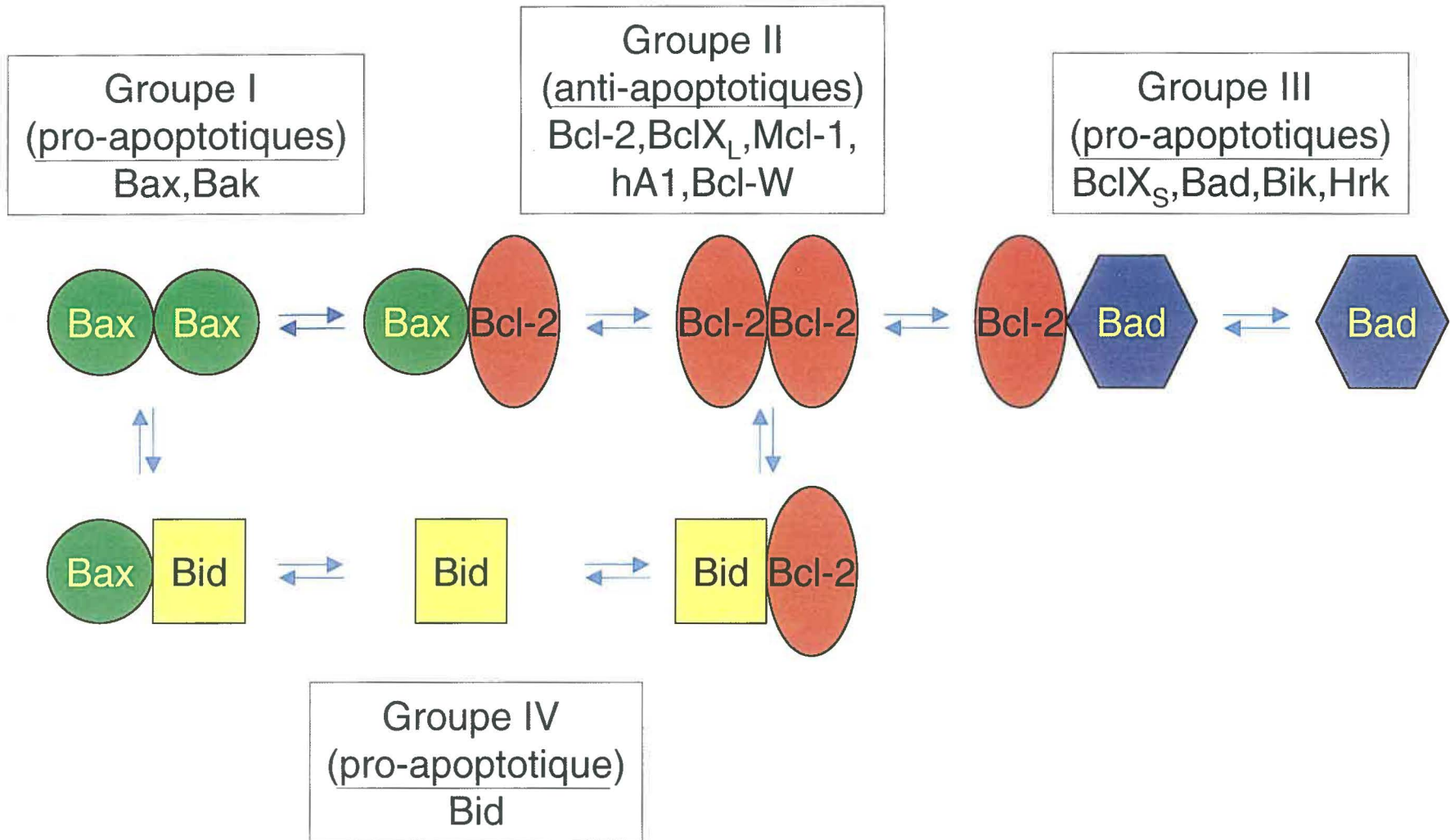
Premièrement, les homologues Bcl-2 peuvent être régulés au point de vue de leur expression. Par exemple, plusieurs homologues Bcl-2 anti-apoptotiques incluant Mcl-1 et Bcl-X_L peuvent être induits transcriptionnellement

par certaines cytokines (Adams et Cory, 1998 ; Chao et Korsmeyer, 1998). Également, Bax peut être induit dans certaines cellules en réponse à un dommage à l'ADN via p53 (Miyashita et Reed, 1995; Han et al., 1996). De plus, il est important de noter que le ratio anti-apoptotique / pro-apoptotique influence la susceptibilité de la cellule à entrer en apoptose (Reed et al., 1996a,b; Adams et Cory, 1998; Zamzami et al., 1998).

Deuxièmement, les homologues Bcl-2 ont la possibilité d'interagir entre eux et de former des homodimères ou des hétérodimères (Oltvai et Korsmeyer 1994; Farrow et Brown, 1996; Antonsson et Martinou, 2000). De plus, la nature de ces interactions est très complexe, mais on peut toutefois grouper les homologues en quatre groupes selon leurs fonctions et leurs interactions avec les autres homologues (Figure 2). Les homologues du groupe I comprenant Bax et Bak, activent l'apoptose et peuvent s'homodimériser et s'hétérodimériser avec les homologues anti-apoptotiques. Les homologues du groupe II comprenant tous les anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, Mcl1, A1), suppriment l'apoptose et peuvent s'homodimériser et s'hétérodimériser avec les pro-apoptotiques. Les homologues du groupe III comprenant: Bad, Bcl-XS, Bik et Hrk, peuvent s'hétérodimériser avec les anti-apoptotiques et il est suggéré que c'est par cette interaction qu'ils effectuent leurs fonctions pro-apoptotiques. Les homologues du groupe III sont toutefois incapables de former des homodimères ou des hétérodimères avec les pro-apoptotiques. Le groupe IV, est représenté par Bid qui est analogue aux homologues du groupe II, excepté

Figure 2. Interactions entre les homologues Bcl-2.

Les homologues sont divisés en quatre groupes selon leurs fonctions anti-apoptotiques ou pro-apoptotiques, et leurs propriétés d'interaction avec les autres homologues. Les homologues du groupe I activent l'apoptose et peuvent s'homodimériser et s'hétérodimériser avec les homologues anti-apoptotiques. Les homologues du groupe II suppriment l'apoptose et peuvent s'homodimériser et s'hétérodimériser avec les pro-apoptotiques. Les homologues du groupe III, peuvent s'hétérodimériser avec les anti-apoptotiques et il est suggéré que ce soit par cette interaction qu'ils effectuent leurs fonctions pro-apoptotiques. Les homologues du groupe III sont toutefois incapables de former des homodimères ou des hétérodimères avec les pro-apoptotiques. Le groupe IV, est représenté par Bid qui est analogue avec les homologues du groupe II excepté qu'il peut former des hétérodimères avec les anti-apoptotiques (groupe II) et les pro-apoptotiques (groupe I). Figure tirée et modifiée de (Wang et Reed, 1998).



qu'il peut former des hétérodimères avec les anti-apoptotiques (groupe II) et les pro-apoptotiques (groupe I) (Wang et Reed, 1998). De plus, les interactions des homologues Bcl-2 avec d'autres types de molécules, comme par exemple l'anti-apoptotique Bag-1, amènent un plus haut niveau de complexité à la régulation des fonctions des homologues Bcl-2.

Troisièmement, l'épissage alternatif est un autre moyen de réguler la fonction des homologues. Par exemple, l'ARNm donnant la forme longue de Bcl-X (Bcl-X_L, un anti-apoptotique) peut être épissé alternativement pour donner la forme courte de Bcl-X (Bcl-X_S, un pro-apoptotique) (Boise et al., 1993). Également, Mcl-1 qui est un anti-apoptotique peut être épissé alternativement ce qui engendre une forme de Mcl-1 qui ne possède que le domaine BH3; sous cette forme Mcl-1 agit à même titre que les pro-apoptotiques de la sous classe BH3 (Bingle et al., 2000).

Quatrièmement, les homologues peuvent être clivés protéolytiquement. Par exemple, Bcl-2 qui est un anti-apoptotique actif, peut être clivé par les caspases et libérer son groupement BH4, formant ainsi un Bcl-2 inactif. Des clivages successifs de Bcl-2, permettent la libération des domaines BH1 et BH2. Bcl-2 ainsi clivé ne possède que le domaine BH3 et devient pro-apoptotique, au même titre que les homologues Bcl-2 pro-apoptotiques de la sous classe BH3 (Cheng et al., 1997). Également, Bcl-X_L (un anti-apoptotique) peut être clivé protéolytiquement par des caspases, formant ainsi Bcl-X_S (un pro-apoptotique) qui est une forme tronquée de Bcl-X_L contenant le domaine

BH3. Bcl-X_S peut également être formé par épissage alternatif de l'ARNm de Bcl-X_L comme mentionné plus haut (Boise et al. 1993). Enfin, Bid est exprimé sous forme inactive (pro-Bid) et peut être clivé protéolytiquement pour générer la forme active pro-apoptotique de Bid (Wang et Reed, 1998; Chen et al., 2001).

Finalement, la phosphorylation permet de réguler la fonction de certains homologues Bcl-2. Par exemple, Bad peut être phosphorylé par Akt (une sérine-thréonine kinase) et devient séquestré par la protéine 14-3-3 qui mène Bad à la dégradation; ainsi, Bad perd sa capacité de se lier à Bcl-2 et Bcl-XL pour inhiber leurs activités anti-apoptotiques (Gajewski et Thompson, 1996; Datta et al., 1997; Schurmann et al., 2000). De plus, selon le système cellulaire, Bcl-2 phosphorylé peut être un anti-apoptotique actif (Chen et Faller, 1996) ou peut voir ses fonctions anti-apoptotiques inhibées (Haldar et al., 1995). Il a également été démontré que la phosphorylation de Bcl-2 à la sérine 70 est nécessaire pour que Bcl-2 joue pleinement sa fonction anti-apoptotique (Ito et al., 1997; Ruvolo et al., 2001).

1.3 L'épithélium intestinal

1.3.1 Structure de l'épithélium intestinal

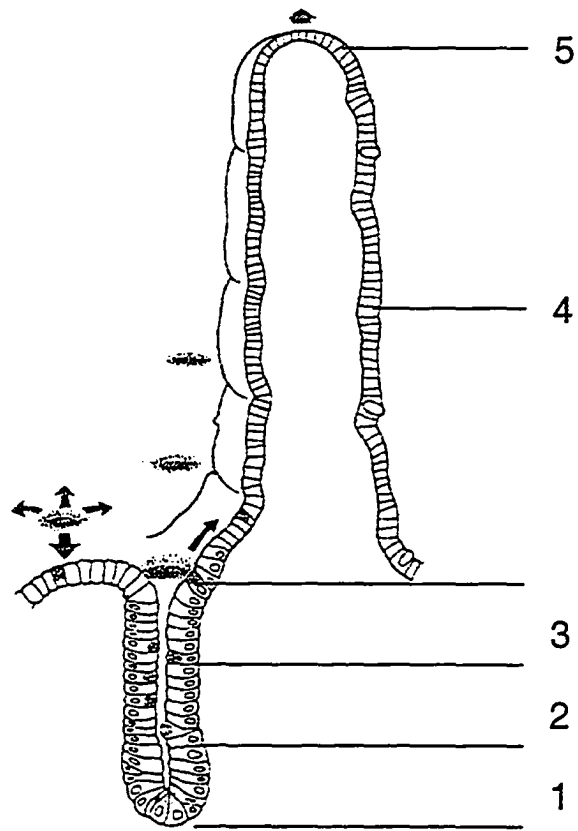
L'épithélium intestinal humain adulte est simple cylindrique. Au niveau du jéjunum, cet épithélium est disposé le long d'une structure appelée l'axe

crypte-villosité (Dauça et al., 1990; Gordon et Hermiston, 1994; Beaulieu 1997) (Figure 3A). Cet épithélium est constamment et rapidement en renouvellement, suivant une séquence bien établie : les cellules du fond de la crypte se divisent, engendrent des cellules filles qui vont se différencier et migrer de la base de la villosité jusqu'à son apex pour enfin être éliminées (Leblond, 1981; Klein et McKenzie, 1983; Louvard et al., 1992; Gordon et Hermiston, 1994). Sur cet axe, on retrouve différents types de cellules à différents stades de différenciation. Au niveau de la base des cryptes se trouvent les cellules souches pluripotentes et indifférenciées qui sont la source du renouvellement épithélial. Ces cellules se divisent et engendrent des cellules filles qui se différencient dans les tiers central et supérieur de la crypte. Ces cellules démontrent des signes de maturité au tiers supérieur des cryptes et sont pleinement matures à la sortie des cryptes. L'épithélium intestinal est composé de quatre principaux types de cellules différenciées: a) les cellules absorbantes ou entérocytes, qui sont polarisées et qui sont majoritaires (à 95-99%), b) les cellules oligomuqueuses ou calciformes, c) les cellules entéroendocrines, et d) les cellules de Paneth (qui, une fois différenciées, demeurent dans les cryptes) (Grand et al., 1976; Leblond, 1981; Gordon, 1989; Ménard, 1989). Une fois arrivées à l'apex des villosités, les cellules épithéliales entrent en apoptose et les corps apoptotiques sont libérés dans la lumière intestinale (Hall et al., 1994). Ceci permet de libérer l'espace pour les cellules épithéliales qui suivent. Ce phénomène de renouvellement de l'épithélium est commun à tous les vertébrés (Dauça et al., 1990; Gordon et Hermiston, 1994).

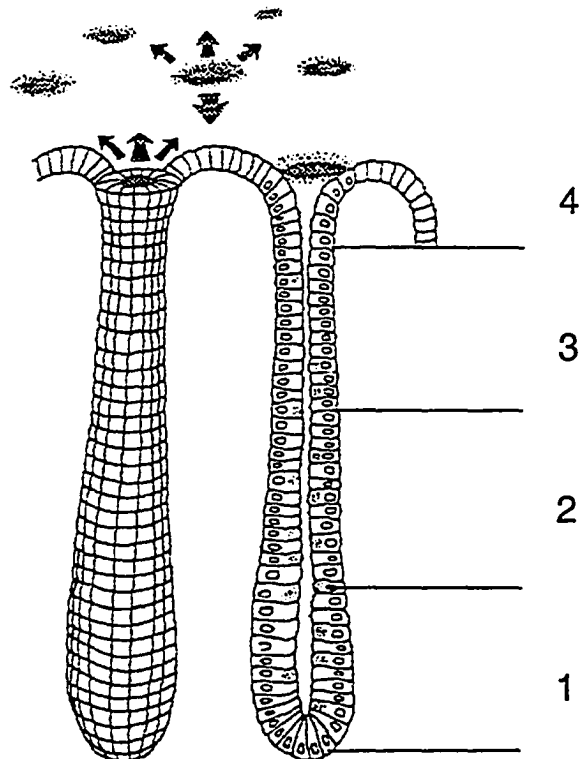
Figure 3. Organisation tridimensionnelle de l'épithélium du jéjunum et du côlon adulte.

A) l'axe crypte-villosité du jéjunum. La crypte est séparée en trois segments : (1) le tiers inférieur contenant les cellules souches responsables du renouvellement, ainsi que les cellules de Paneth ; (2) la mi-crypte, contenant les cellules déterminées mais indifférenciées ; et (3) le tiers supérieur, contenant les cellules en différenciation. L'épithélium de la villosité (4) est formé de cellules différenciées et fonctionnelles, c'est à dire les entérocytes qui absorbent, les cellules calciformes qui excrètent le mucus et les cellules entéroendocrines qui sécrètent des hormones gastrointestinales (telles la CCK, la somatostatine, l'entéroglucagon, etc.). L'apex de la villosité (5) est le site où les cellules sont éliminées par apoptose. B) L'axe de la crypte du côlon est séparé en quatre segments: (1) la base de la crypte, où se trouvent les cellules souches. La crypte centrale (2) et supérieure (3), contenant les cellules différenciées et fonctionnelles. La surface luminale (4), où les cellules sont éliminées par apoptose. Figure tirée et modifiée de (Potten, 1998).

A)



B)



Malgré qu'ils proviennent du même tube digestif primitif, la muqueuse intestinale du jéjunum et du côlon adulte diffèrent quant à leurs organisations et leurs fonctions physiologiques. En effet, l'épithélium du jéjunum adulte est disposé le long d'un axe crypte-villosité comme on vient de le voir tandis que celui du côlon adulte est plutôt disposé le long de grandes cryptes similaires aux glandes (Figure 3B) (Leblond, 1981; Ménard 1989; Cobb et Williamson, 1991; Ménard et Calvert, 1991; Ménard et Beaulieu, 1994; Jones et Gores, 1997; Potten, 1997). De plus, la fonction de l'intestin grêle se situe au niveau de la digestion et de l'absorption des nutriments tandis que celle du côlon est principalement de réguler le fluide luminal et les électrolytes (Ménard 1989; Binder et al., 1991; Cobb et Williamson, 1991; Ménard et Calvert 1991; Ménard et Beaulieu, 1994). Enfin, l'apoptose se situe normalement au niveau de la surface luminale du côlon (Figure 3B4) comparativement au jéjunum (Figure 3A5).

Des différences importantes existent également entre l'épithélium intestinal du modèle animal (le plus souvent murin) et celui de l'humain. Ces différences physiologiques et génétiques sont mises en évidence au cours de l'établissement de l'axe crypte-villosité, dans l'émergence des enzymes de la bordure en brosse, ainsi que dans les influences exercées par les hormones et facteurs de croissance dans la maturation de l'épithélium intestinal (Ménard 1989; Louvard et al., 1992; Ménard et Beaulieu 1994). Il en va de même dans l'expression des homologues Bcl-2 le long de l'axe crypte-villosité adulte (Krajewski et al., 1994a, b, Moss et al., 1996b; Shaposhnikov et al., 1996).

C'est pourquoi, il est difficile de transposer à l'humain les résultats obtenus avec les modèles animaux concernant le tube digestif.

1.3.2 Développement de l'épithélium intestinal

Le développement de l'intestin a été le sujet de plusieurs revues (Grand et al., 1976; Colony et Neutra, 1983; Ménard 1989; Ménard et Calvert, 1991; Beaulieu 1994). Les principaux événements ainsi que la séquence qui caractérisent le développement de l'intestin sont comparables d'une espèce animale à une autre, même si la chronologie est différente (Ménard, 1989; Dauça et al., 1990; Ménard et Calvert, 1991). Contrairement aux rongeurs, la morphologie et les fonctions de la muqueuse intestinale sont acquises tôt chez le fœtus humain.

On peut distinguer plusieurs stades importants lors de la morphogenèse du tube digestif. Les stades sont les suivants: à 7-8 semaines de gestation, la paroi intestinale est couverte d'un épithélium pluristratifié et non-différencié. Dès la neuvième semaine, la villogénèse s'amorce par infiltration mésenchymateuse de l'épithélium. À 12 semaines, l'intestin grêle est recouvert de courtes villosités qui sont revêtues d'un épithélium simple cylindrique. De 15 à 17 semaines de gestation, la cryptogénèse s'effectue et des cryptes peu profondes apparaissent. Finalement, de 18 à 20 semaines de gestation, l'épithélium intestinal ressemble déjà structurellement et fonctionnellement à celui de l'intestin grêle adulte; ainsi, de grandes villosités sont présentes, les

cryptes sont bien développées, et les activités des enzymes de la bordure en brosse sont présentes et hautement comparables aux niveaux retrouvés chez l'adulte (Ménard, 1989; Ménard et Calvert, 1991; Ménard et Beaulieu, 1994; Beaulieu, 1997). Il est très important de noter que les stades de développement sont semblables pour le jéjunum, l'iléon et le côlon jusqu'à la première moitié de gestation. En effet, à la mi-gestation (18-20 semaines) toute la muqueuse intestinale (du duodénum au côlon) est organisée le long d'un axe crypte-villosité fonctionnel, qui est très similaire à celui du jéjunum adulte, incluant les capacités digestives et la dynamique de renouvellement cellulaire (Ménard, 1989; Ménard et Calvert, 1991; Ménard et Beaulieu, 1994). Au cours du dernier tiers de gestation (environ 30 semaines à la naissance), les villosités du côlon disparaissent et de grandes cryptes semblables aux glandes sont formées (Ménard 1989; Ménard et Beaulieu, 1994; Beaulieu, 1997).

1.3.3 Apoptose de l'épithélium intestinal

Tout d'abord, l'épithélium intestinal est un modèle utile pour l'étude *in-vivo* de l'établissement et du processus responsable de la régénération des tissus incluant l'apoptose. (Leblond, 1981; Jones and Gores, 1997; Potten, 1997). De plus, dans le contexte d'un renouvellement rapide et continu des cellules de l'épithélium, l'apoptose est le destin normal des cellules à l'apex des villosités du jéjunum adulte, ainsi qu'au niveau des cellules de surface du côlon adulte (Moss et Holt, 1996; Jones et Gores, 1997; Potten, 1997; Barkla et Gibson, 1999). Aussi, nous avons préalablement démontré que l'apoptose

n'apparaît qu'à partir de la 18^{ième} semaine de gestation au cours du développement du jéjunum et qu'elle se situe, tout comme chez l'adulte, à l'apex des villosités (Vachon et al., 2000). Finalement, un rôle pour certains homologues Bcl-2 (notamment Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1 et Bak) a été proposé dans la régulation de l'apoptose de l'épithélium intestinal adulte chez le jéjunum et le côlon, une fonction possible qui est bien illustrée par leur patron différentiel (ou gradient) d'expression entre les cellules non-différenciées de la crypte et différenciées de la villosité (Hockenbery et al., 1991; Lu et al., 1993; Krajewski et al., 1994c 1995, 1996; Krajewska et al., 1996; Moss et al., 1996a; Liu et al., 1999).

1.3.4 Les homologues Bcl-2 de l'épithélium intestinal

La caractérisation du profil d'expression des homologues Bcl-2 des tissus constitue une étape cruciale dans la compréhension de la régulation de l'apoptose dans les systèmes de régénération et de développement de ces tissus (Hale et al., 1996; Moss et Holt, 1996; Reed et al., 1996a; Jacobson et al., 1997; Potten, 1997; Adams and Cory, 1998).

1.3.4.1 Expression épithéliale des homologues Bcl-2

Chez l'intestin adulte humain, certains homologues sont présents au niveau de l'épithélium du jéjunum et du côlon. Quelques-uns ont été localisés chez l'adulte le long de l'axe crypte-villosité du jéjunum et de la crypte du côlon.

Principalement, Bcl-2 a été localisé par immunohistochimie au niveau des cryptes (Bronner et al., 1995); cependant, un autre groupe ne détecte Bcl-2 que sporadiquement dans les cryptes (Merritt et al., 1995). Mcl-1 est présent tout le long de la villosité, mais est absent ou très faiblement présent dans les cryptes (Krajewski et al., 1995). Bcl-X est exprimé par les cellules de la villosité et par les cellules de la crypte; cependant, les cellules de Paneth n'expriment pas Bcl-X (Krajewski et al., 1994b). Bak est très fortement exprimé au niveau des villosités et faiblement exprimé au niveau de la crypte (Krajewski et al., 1996; Moss et al., 1996a). Enfin, Bad se retrouve faiblement dans les cellules absorbantes de la villosité et est absent des cellules de Paneth de la crypte (Kitada et al., 1998).

Pour ce qui est du côlon adulte, Bcl-2 a également été localisé au niveau de l'épithélium à la base de la glande (Hague et al., 1994; Bosari et al., 1995; Bronner et al., 1995; Merritt et al., 1995; Kaklamaris et al., 1996; Watson et al., 1996; Ogura et al. 1999). Mcl-1 est présent tout le long de la glande mais est absent des cellules souches de la base de la glande (Krajewski et al., 1995). Bcl-X est exprimé faiblement à modérément, et semble plus faible au niveau du fond de la crypte (Krajewski et al., 1994b). Bak, Bax et Bcl-X_LS ont été observés à la surface luminale de la glande (Ogura et al., 1999). Bak est très fortement exprimé surtout au niveau de la surface luminale, cependant son expression est faible au niveau de la base de la crypte (Krajewski et al., 1996).

Enfin, Bad est présent dans les cellules absorbantes et légèrement moins exprimé dans les cellules de Goblet (Kitada et al., 1998).

D'après ces travaux, autant au niveau du jéjunum que du côlon, on voit bien que peu est connu sur l'expression des homologues Bcl-2 le long de l'axe crypte-villosité du jéjunum et de la crypte du côlon. En effet, les observations sont souvent contradictoires puisqu'elles sont effectuées tant chez les rongeurs que chez l'humain. Aussi, l'expression des homologues Bcl-2 n'a pas encore été vérifiée au niveau de l'iléon ni au cours du développement. Il est donc important de noter que très peu est connu sur l'expression des homologues Bcl-2 au niveau de l'épithélium intestinal, d'autant plus au cours du développement, et qu'il semble exister des différences d'expression de certains homologues entre les segments de l'intestin. Par exemple, Bcl-X_L qui se retrouve tout le long de l'axe crypte-villosité du jéjunum, est pratiquement absent dans le côlon (Hockenbery et al., 1991; Lu et al., 1993; Krajewski et al., 1994c, 1995, 1996; Meritt et al., 1995; Krajewska et al., 1996; Wison et Potten, 1996; Hirose et al., 1997; Wilson et al., 2000).

1.3.4.2 Importance des homologues Bcl-2 au niveau de l'épithélium intestinal

L'apoptose et les homologues Bcl-2 qui la régulent sont importants pour le maintien et le bon fonctionnement de l'épithélium intestinal. En effet, certains dérèglements de l'expression et de la localisation des homologues Bcl-2 ont été identifiés, impliquant un dysfonctionnement de l'apoptose dans des pathologies comme le cancer du côlon, la polypose adénomateuse familiale, la maladie de Crohn, la maladie de coélie ainsi que la colite ulcéreuse (Butler et al., 1999; Ciccocioppo et al., 1999;). Plusieurs études ont observé une augmentation de Bcl-2 dans tout l'épithélium du côlon, augmentation qui variait selon l'avancement de la tumorigénèse (Bedi et al., 1995; Bronner et al., 1995; Nakamura et al., 1995). D'autres, ont plutôt observé une légère diminution de Bcl-2 selon l'avancement de la tumorigénèse, conjointement à des variations dans l'expression des homologues Bcl-X (augmentation) et Bak (diminution) (Krajewska et al., 1996; Maurer et al., 1998). Bax serait fréquemment muté lors de cancer (Ouyang et al., 1998; Yagi et al., 1998; Yamamoto et al., 1998;). Même si ces résultats obtenus à partir de tissus pathologiques demeurent contradictoires, la plupart démontrent un dérèglement de l'expression d'un ou plusieurs homologues Bcl-2, suggérant ainsi un rôle important des homologues Bcl-2 dans le bon fonctionnement de l'épithélium intestinal. Il existe également des différences entre le jéjunum et le côlon au niveau des physiopathologies impliquant des dérèglements de l'apoptose. En effet, plusieurs de ces maladies montrent des caractéristiques épidémiologiques qui semblent être spécifiques

aux segments de l'intestin (Ahnen, 1991; Kagnoff, 1995; Stenson, 1995). Un bon exemple de ceci est le cancer du côlon dont l'incidence est beaucoup plus élevée que celle de l'intestin grêle (Ahnen, 1991; Mendeloff, 1991). On pense que ces différences, ainsi que celles observées pour l'expression des homologues, reflètent des mécanismes de contrôle de l'apoptose spécifiques aux segments, qui pourraient également être responsables (au moins en partie) de l'apparente préférence pour un segment de certains désordres impliquant un dérèglement de l'apoptose. (Potten, 1992; 1997; Jones et Gores, 1997).

1.4 Hypothèse

Nous avons préalablement établi que l'apoptose apparaissait tôt au cours du développement mais nous n'avons pas vérifié ses mécanismes de régulation.

Les homologues Bcl-2 qui régulent l'apoptose constituent un point de contrôle critique en amont des effecteurs responsables des caractéristiques de l'apoptose. La caractérisation du profil d'expression de ces homologues dans les tissus est une étape cruciale dans la compréhension de la régulation de l'apoptose de ces tissus. On a également vu qu'il y a des différences entre les segments de l'intestin et ce, non seulement au niveau de la structure et du développement, mais aussi au niveau des incidences de certaines pathologies et de l'expression épithéliale des homologues Bcl-2. Il est donc important de faire nos observations sur les différents segments de l'intestin (le jéjunum,

l'iléon et le côlon) afin de mettre en évidence des mécanismes de contrôle de l'apoptose possiblement différents. Notre hypothèse est donc que l'établissement des mécanismes de contrôle de l'apoptose entérocytaire spécifique aux segments se ferait parallèlement à la morphogenèse et la maturation de l'axe crypte-villosité.

1.5 Objectifs du projet de recherche

Le premier objectif sera d'analyser l'expression épithéliale des homologues Bcl-2 le long de l'axe crypte-villosité au cours du développement du jéjunum, de l'iléon et du côlon foetal humain. Le second objectif sera d'analyser les niveaux d'expression des homologues Bcl-2 selon le gradient proximal-distal (c'est à dire du jéjunum, à l'iléon, au côlon) au cours du développement foetal humain. Ces deux objectifs nous permettront de caractériser l'expression des homologues Bcl-2 au cours du développement de l'épithélium intestinal ainsi que de vérifier l'établissement des mécanismes de régulation de l'apoptose au cours de sa morphogenèse pour ses différents segments (jéjunum, iléon, côlon).

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Analyse de l'expression épithéliale des homologues Bcl-2 au cours du développement.

L'analyse de l'expression épithéliale *in situ* des homologues Bcl-2 au cours du développement du tractus digestif a été effectuée par immunofluorescence indirecte sur des coupes en congélation de spécimens de jéjunum, d'iléon et de côlon fœtaux humains à différents stades de développement de 9 à 20 semaines de gestation.

2.1.1 Préparation des tissus

Des spécimens de jéjunum, d'iléon et de côlon fœtaux humains âgés de 9 à 20 semaines (plus de trois spécimens par stade et par segment), ont été prélevés suite à des interruptions volontaires de grossesses. Ces travaux ont été effectués sous l'approbation du Comité institutionnel d'Éthique pour la Recherche sur les Matériaux Biologiques Humains. Les spécimens ont été coupés en fragments d'environ 1 à 2 cm, rincés rapidement dans le PBS (Phosphate Buffered Saline ; 137mM NaCl, 2.7mM KCl, 8mM Na₂PO₄, 1.5mM KH₂ PO₄ ; pH 7.4) et le surplus de PBS a été drainé par capillarité sur un papier filtre (3mm Chr, Watman international ltd., Maldstone, England). Ces fragments ont été ensuite déposés verticalement dans de petits cylindres d'aluminium

remplis d'O.C.T ("Optimum Cutting Temperature embedding compound" (Sakura Finetek, Torrance, CA, USA) et immédiatement congelés dans l'azote liquide. Les blocs-spécimens ont été conservés à -80°C .

Des coupes de $6\mu\text{m}$ d'épaisseur, obtenues à l'aide d'un couteau d'acier monté sur un cryomicrotome "Jung Frigocut 2800N" (Leica - Reichert division, Allemagne) pré-réfrigéré à -24°C , ont été étalées par différence de température sur des lames ("Premium, Frosted" ; Fisher Scientifique, Montréal, Québec) en apposant les lames directement sur les coupes froides. Les coupes ont été ensuite séchées sur une plaque chauffante à 37°C pour environ 60 minutes, mais jamais plus que 90 minutes, puis conservées hermétiquement à -80°C .

2.1.2 Immunofluorescence indirecte

La méthode générale (basée sur la procédure décrite par Quaroni et Isselbacher (1985) a été la suivante : les coupes ont été fixées pendant 10 minutes à -20°C , suivit de trois lavages de 5 minutes au PBS. Pour certaines expériences (voir Tableau 1), une fixation à la formaldéhyde 2%-PBS, pendant 45 minutes à 4°C a été utilisée. Après trois lavages au PBS, les lames ont été incubées dans une solution de glycine 100mM – PBS (pH 7.4) pendant 45 minutes à 4°C , pour neutraliser les groupes aldéhydes libres. Cette incubation a été suivie de trois autres lavages de 5 minutes au PBS.

Avant d'effectuer la réaction d'immunofluorescence, 50µl de solution de blocage (5% de lait en poudre sans matières grasses ("Blotto" ; Johnson et al. , 1984) préalablement centrifugés à 10000 RPM (Rotations par minute) pendant 5 minutes pour enlever les agglomérats et rendre le blocage homogène) ont été déposés sur les coupes puis incubées en chambre humide à 23°C pendant 30 minutes. Cette étape permet d'effectuer un "blocage par saturation" (Harlow et Lane, 1988). Par la suite, les coupes ont été rincées rapidement 2 fois dans le PBS pour enlever le surplus de Blotto.

Pour la réaction d'immunofluorescence, 50 µl de l'anticorps primaire (polyclonal ou monoclonal) (voir section 2.3), dilué dans 5% Blotto – PBS, ont été déposés sur les coupes. Pour les coupes contrôles, les anticorps primaires ont été remplacés par du Blotto 5%. Ces coupes ont ensuite été incubées dans une chambre humide à 23°C pendant 60 minutes, suivit de trois lavages de 5 minutes dans le PBS. 50 µl de l'anticorps secondaire (anti-lapin provenant de l'âne ou anti-souris provenant de la chèvre, tous les deux dilués 1/30 dans 10 % de Blotto conjugués à l'*FITC* (fluorescéine isothio-cyanate) ont été incubés sur les coupes dans les mêmes conditions que l'anticorps primaire. Ensuite, les coupes ont été rincées 3 fois dans le PBS avant d'être colorées au bleu d'Évans 0.01% (dans PBS) pendant 30 secondes, puis rincées de nouveau 3 fois 5 minutes dans du PBS. Finalement, les lamelles ont été montées avec VectaShield (Vecton laboratories inc. Burlingame, Californie, USA) ou glycérol :

PBS (9:1 pH 7.5) contenant 1% de paraphénylènediamine (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada) (Harlow et Lane, 1988).

Les lames ont été ensuite observées à l'aide d'un microscope Polyvar2 (Leica AG - Reichert division, Australie) équipé pour l'épifluorescence. L'observation d'émission fluorescente du FITC a été effectuée avec un filtre laissant passer les longueurs d'ondes d'environ 528nm (vert) tandis que la visualisation des tissus colorés au bleu d'Évans, a été effectuée avec un filtre laissant passer les longueurs d'ondes d'environ 617nm (orange). Des photographies représentatives ont été prises sur films Tri-X pan 400 ASA (Kodak).

2.2 Analyse des niveaux d'expression des homologues Bcl-2 par western blot.

L'analyse de l'expression protéique des homologues Bcl-2 au cours du développement du tractus digestif a été effectuée par Western blot à l'aide d'homogénats de la muqueuse du jéjunum, de l'iléon et du côlon fœtaux humains à différents stades de développement de 10 à 20 semaines de gestation.

2.2.1 Préparation des tissus

Afin d'analyser l'expression des homologues Bcl-2, des spécimens de jéjunum, d'iléon et de côlon fœtaux âgés de 10 à 20 semaines (9 pour chaque stade excepté, au stade de 10 à 12 semaine où 6 spécimens ont été prélevés au total) ont été prélevés suite à des interruptions volontaires de grossesses. Les spécimens ont été rincés rapidement au PBS puis congelés à -80°C . Avant de solubiliser les protéines pour la séparation par SDS-PAGE (électrophorèse sur gel polyacrylamide contenant du (SDS) sodium dodecyl sulfate), les spécimens ont été dégelés sur glace, ouverts, et le méconium a été ensuite enlevé en rinçant vigoureusement dans du PBS froid (4°C). Une lamelle a été utilisée pour gratter l'intérieur des spécimens afin d'enlever le muscle et une partie du mésenchyme, conservant ainsi la muqueuse. La muqueuse a été déposée dans un tube à essai et 10ml de tampon d'homogénéisation (125 mM Tris-HCl pH 6.8 ; 0.1mM PMSF ; 50 $\mu\text{g/ml}$ aprotinine, leupeptine et antipaine) par gramme de tissu ont été ajoutés afin d'homogénéiser les spécimens par sonication. Les tissus ont été conservés sur glace pour les étapes subséquentes. Trois sonications de 15 secondes (sonicator ultra sonic processor XL ; Mandel Scientific Company, Guelph, Ontario, Canada) ont été effectuées, suivies d'une centrifugation à 3000 RPM pendant 1 minute afin d'enlever les débris non homogénéisés et le surnageant a été conservé. Afin de maximiser l'homogénéisation, 25 à 50 μl de tampon d'homogénéisation ont été ajoutés au culot et les étapes de sonication et de

centrifugation ont été reprises puis les deux surnageants ont été combinés. Du tampon de solubilisation 4X ("Tampon de Laemmli", Cleveland et al., 1977) et du β -mercaptoéthanol ont été ajoutés aux homogénats pour avoir une concentration finale de tampon de solubilisation de 1X et 5% de β -mercaptoéthanol. Les échantillons ont été chauffés à 100°C pendant cinq minutes et centrifugés pendant cinq minutes à 15000 RPM. Par la suite, les échantillons ont été dosés par la méthode de Lowry afin de connaître leur contenu en protéines et de pouvoir faire migrer les mêmes quantités de protéines sur SDS-PAGE. Finalement, les échantillons solubilisés ont été conservés à -80°C.

2.2.2 Western blot

Afin d'effectuer la séparation des protéines par SDS-PAGE, les échantillons ont été dégelés et ramenés à température de la pièce (20°C). De ces échantillons, 30 μ g de protéines (pour chaque puits à charger) ont été prélevés, puis chauffés à 100°C pendant 2 minutes. Un puits a été réservé sur chaque gel de polyacrylamide pour charger les marqueurs de poids moléculaires (Prestained SDS-PAGE Standards, Broad Range; Biorad Laboratories, Hercules, California, USA). Les protéines ont été séparées par électrophorèse sur gel de SDS-polyacrylamide 15 % (SDS-PAGE) (Ready Gel 50 μ l, BioRad Laboratories, Mississauga, Ontario). Le tampon d'électrophorèse était constitué de 25mM Tris, 3.5 mM SDS et 142 mM glycine (pH 8.7).

L'électrophorèse a été réalisée à la température de la pièce à un voltage de 170 volts pendant 5 minutes suivie d'un voltage constant de 100 volts durant environ 1 heure et 30 minutes (Power Pack 200, BioRad Laboratories, Mississauga, Ontario). Par la suite, le gel a été récupéré pour électro-transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose (Life Technologies/Gibco BRL, Burlington, Ontario). Le transfert des protéines du gel polyacrylamide vers la membrane de nitrocellulose a été effectué à 100 volts pendant 60 minutes (Power Pack 200, BioRad Laboratories, Mississauga, Ontario) dans un tampon de transfert contenant 25mM Tris, 142mM glycine et 20 % de méthanol (pH8.5). Après le transfert, la membrane de nitrocellulose a été incubée dans une solution de blocage 10% Blotto – PBS contenant 0.05% du détergent Tween20 (Biorad Laboratories, Mississauga, Ontario) et 5% d'azide de sodium à la température de la pièce pendant 18 heures. La membrane a été ensuite incubée, à la température de la pièce avec une légère agitation, en présence de l'anticorps primaire (voir section 3), qui a été dilué avec l'agent bloquant. Le temps d'incubation, les dilutions et l'agent bloquant se trouvent au Tableau II. L'incubation avec l'anticorps primaire a été suivie de quatre lavages de 10 minutes avec 0.05% Tween -PBS et 1 heure dans la solution de blocage. Par la suite, une incubation a été réalisée avec les anticorps secondaires sous agitation constante, à la température de la pièce, pour une heure. Selon la source de l'anticorps primaire (voir Tableau II), les anticorps secondaires utilisés étaient soit l'anti-IgG de souris ou l'anti-IgG de lapin liés à la HRP (HorseRadish Peroxydase; Amersham Pharmacia Biotech, Baie d'Urfé, Québec, Canada). Ensuite, deux lavages de 10 minutes chacun avec 0.05%

TWEEN - PBS et deux autres lavages de dix minutes avec du PBS ont été effectués. La détection a été effectuée par chemiluminescence à l'aide du système de révélation ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Baie d'Urfé, Québec, Canada). La membrane a été déposée dans un sac en plastique scellé contenant la solution de révélation (300 µl de la solution A et 300 µL de la solution B) pour une incubation de cinq minutes. La révélation des protéines a ensuite été réalisée avec un film (Hyperfilm™ ECL™ 8X10" ; Amersham Pharmacia Biotech, Baie d'Urfé, Québec, Canada). L'intensité des bandes obtenues a été quantifiée par densitométrie à l'aide du système Multimage™ DE-400 (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, Californie, USA). Le traitement des données a été effectué par le système d'analyse et d'archivage Alphamager™ 1200 (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, Californie, USA).

2.3 Les anticorps utilisés

Les Tableaux I et II donnent la liste des anticorps utilisés pour l'immunofluorescence indirecte (Tableau I) et pour les Western blot (Tableau II) (Beaulieu et Vachon 1994; Reed 1996; Vachon et al. , 1996). Huit anticorps au total ont été utilisés pour détecter les homologues Bcl-2. Les mêmes anticorps ont été utilisés pour les Western blot et pour l'immunofluorescence à l'exception de Mcl-1(K-20) qui a été utilisé pour la détection de Mcl-1 en Western blot et 1682-12 pour la détection du même homologue en immunofluorescence indirecte.

Trois anticorps ont été utilisés pour évaluer les proportions d'épithélium et de mésenchyme des homogénats en Western blot. Le clone Cy-90 qui reconnaît la cytokératine-18 (un marqueur des cellules épithéliales), le clone Vim3B4 qui reconnaît la vimentine (un marqueur des cellules mésenchymateuses) et le clone C4 qui reconnaît l'actine (un marqueur de toutes les cellules).

Les anticorps secondaires utilisés pour les Western blot soit l'anti-IgG de souris ou l'anti-IgG de lapin liés à la peroxydase sont commerciaux (Amersham Pharmacia Biotech, Baie d'Urfé, Québec, Canada). Les anticorps secondaires utilisés pour l'immunofluorescence indirecte soit l'anti-IgG de souris ou l'anti-IgG de lapin conjugué à la fluorescéine sont commerciaux (Roche Diagnostic / Boehringer Mannheim, Laval, Québec, Canada).

2.3.1 Les anticorps polyclonaux de lapin

Mcl-1(K-20) est un anticorps commercial purifié par affinité et dirigé contre Mcl-1 (SantaCruz Biotechnology Inc., SantaCruz, CA, USA).

Tous les anticorps suivants sont un don du Dr J.C. Reed (The Burnham Institute, Lajolla, CA, USA) : 1682-12 est un antisérum dirigé contre Mcl-1 humain ; 1695-5 est un antisérum dirigé contre Bcl-X_L de la souris et humain ; 1712-12 est un antisérum dirigé contre Bax humain ; 1764-8 est un antisérum dirigé contre Bak humain ; 1701-10 est un antisérum dirigé contre Bcl-2 humain.

2.3.2 Les anticorps monoclonaux de souris

K56C8 est un anticorps dirigé contre Bag-1 humain et nous a été fourni par Dr. J.C. Reed (The Burnham Institute, La Jolla, Ca, USA); le clone 48 est un anticorps commercial dirigé contre Bad (Transduction Laboratories, Mississauga, Ontario, Canada) ; le clone C4 est un anticorps commercial qui reconnaît les 6 isoformes d'actine des vertébrés (Roche diagnostique/Boehringer Mannheim, Laval, Québec, Canada) ; le clone Vim3B4 est un anticorps commercial qui est dirigé contre la vimentine (Roche diagnostique/Boehringer Mannheim, Laval, Québec, Canada) ; le clone Cy-90 est un anticorps commercial dirigé contre la cytokeratine et spécifique pour la forme peptide 18 (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada).

TABLEAU I

Immunofluorescence indirecte sur des coupes transversales de jéjunum, d'iléon et de côlon fœtaux humains : anticorps utilisés pour l'étude de l'expression des homologues Bcl-2 anti-apoptotiques (Bcl-2, Bag-1, Bcl-X_L, Mcl-1) et pro-apoptotiques (Bad, Bax, Bak).

Anticorps	Source	Forme	Antigène	Agent fixateur	Agent bloquant	Dilutions/ (Références) ²
1682-12	Lapin	AS ¹	Mcl-1	A ¹	Blotto ¹ 5%	1/200/(4)
1701-10	"	"	Bcl-2	"	"	1/200/(1)
1695-5	"	"	Bcl-X _L	"	"	1/200/(2)
1712-12	"	"	Bax	"	"	1/250/(3)
1764-8	"	"	Bak	"	"	1/200/(5)
K56C8	Souris	LA ¹	Bag-1	F ¹	"	1/100/(7)
Clone 48	"	"	Bad	A	"	1/100/(6)

¹ **Abréviations** : **A**, acétone ; **AS**, antisérum ; **Blotto**, lait en poudre sans matières grasses ; **LA**, Liquide ascitique ; **F**, Formaldéhyde.

² Dilutions déterminées empiriquement. 1, Bronner et al., 1995 ; 2, Krajewski et al., 1994 ; 3- Krajewski et al., 1994b ; 4, Krajewski et al., 1995 ; 5, Krajewski et al., 1996 ; 6, Scheid et al., 1998 ; 7, Takayama et al., 1998.

TABLEAU II

Western blot fait à partir d'homogénats de jéjunum, d'iléon et de côlon**foœtaux humains** : anticorps monoclonaux (de souris) et polyclonaux (de lapin)

utilisés pour l'étude de l'expression des homologues Bcl-2 anti-apoptotiques

(Bcl-2, Bag-1, Bcl-X_L, Mcl-1) et pro-apoptotiques (Bad, Bax, Bak).

Anticorps	Source	Forme	Antigène	Agent bloquant	Dilutions/ (Références) ²	Temps d'incubation
Mcl-1(K-20)	Lapin	ASPA ¹	Mcl-1	Blotto ¹ 10%	1/200/(NA)	2 h
1701-10	"	As ¹	Bcl-2	"	1/500/(1)	2 h
1695-5	"	"	Bcl-X _L	"	1/1000/(2)	2 h
1712-12	"	"	Bax	"	1/1000/(3)	1 h
1764-8	"	"	Bak	"	1/1500/(4)	2 h
K56C8	Souris	LA ¹	Bag-1	"	1/1000/(6)	1 h 30
Clone 48	"	"	Bad	Blotto 5%	1/500/(5)	1 h
Clone CY-90	"	"	K-18 ¹	Blotto 10%	1/5000/(NA)	1 h
CloneVim3B4	"	LAPA ¹	Vim	"	1/500/(NA)	2 h
Clone C4	"	"	Actine	"	1/2000/(NA)	1 h

¹ **Abréviations** : **AS**, antisérum ; **ASPA** antisérum purifié par affinité ; **Blotto**, lait en poudre sans matières grasses ; **K-18**, cytokeratin-18 ; **LA**, liquide ascitique ; **LAPA** liquide ascitique purifié par affinité.

² Dilutions déterminées empiriquement.1, Bronner et al., 1995 ; 2, Krajewski et al., 1994 ; 3- Krajewski et al., 1994b ; 4, Krajewski et al., 1996 ; 5, Scheid et al., 1998 ; 6, Takayama et al., 1998.

III. RÉSULTATS

3.1 Expression épithéliale des homologues Bcl-2 le long de l'axe crypte villosité au cours du développement du jéjunum, de l'iléon et du côlon foetal humain.

Nous avons étudié l'expression des homologues Bcl-2 pro-apoptotiques Bax, Bak, Bad et anti-apoptotiques Bcl-2, Mcl-1, Bcl-X_L, en plus de la molécule anti-apoptotique Bag-1. Pour ce faire, nous avons utilisé la méthode d'immunofluorescence indirecte sur des sections transversales de jéjunum, d'iléon et de côlon foetal humain de 9 à 20 semaines de gestation que nous avons sondées à l'aide de plusieurs anticorps monoclonaux et polyclonaux spécifiques (voir Tableau I). Comme nous le verrons dans les sections suivantes, l'expression épithéliale des homologues Bcl-2 subit des changements importants au niveau de leur localisation le long de l'axe crypte-villosité au cours du développement et, ce, différenciellement chez le jéjunum, l'iléon et le côlon humain. Il est à noter que le marquage de tous les homologues étudiés est principalement détecté au niveau de l'épithélium intestinal de tous les stades de développement (9-20 semaines) et que les éléments cellulaires du mésenchyme sont faiblement et/ou sporadiquement marqués dépendant de la molécule analysée.

3.1.1 Expression épithéliale des homologues Bcl-2 chez le jéjunum, l'iléon et le côlon fœtal humain de 9 à 14 semaines.

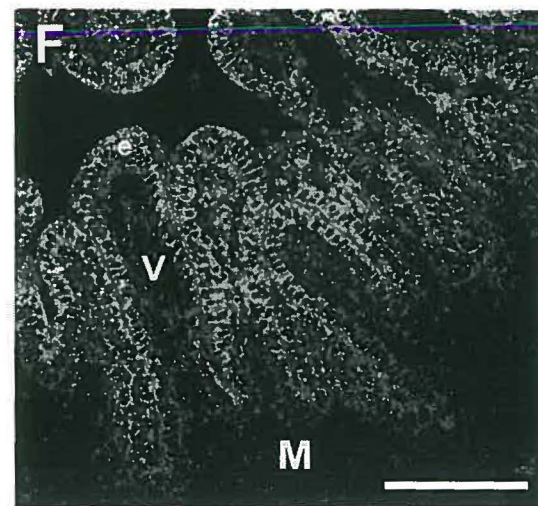
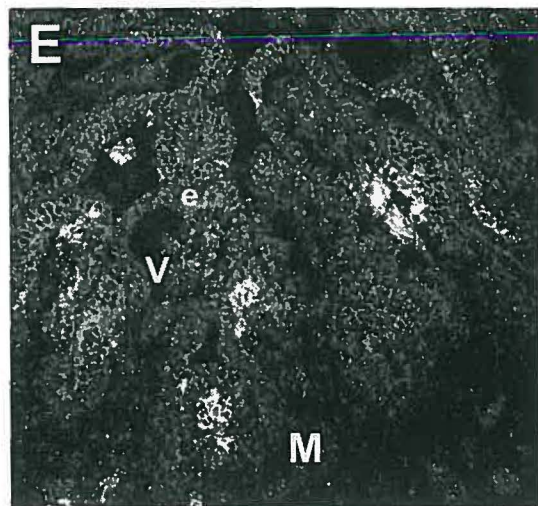
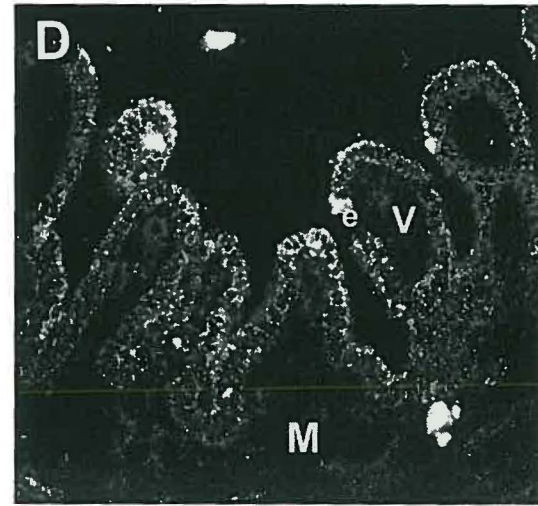
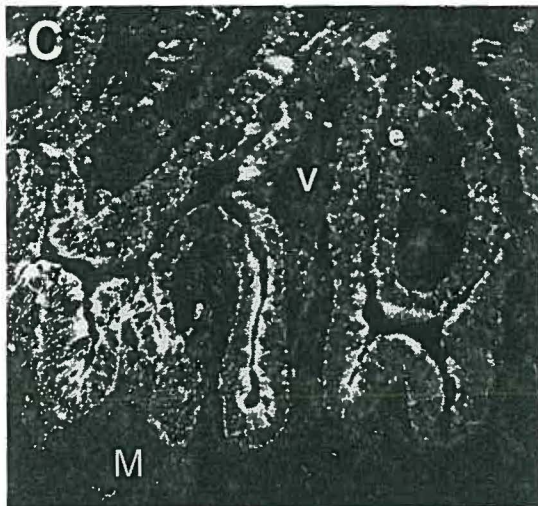
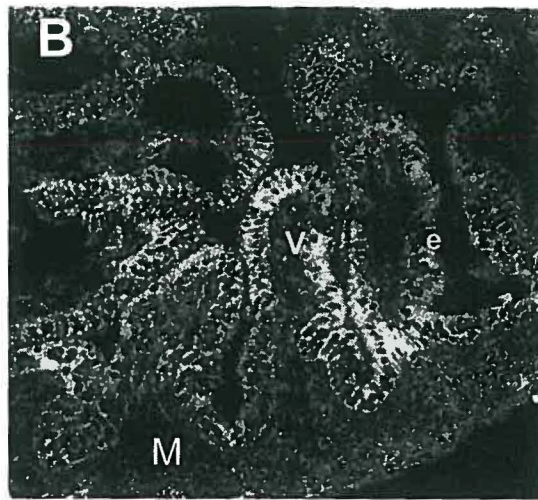
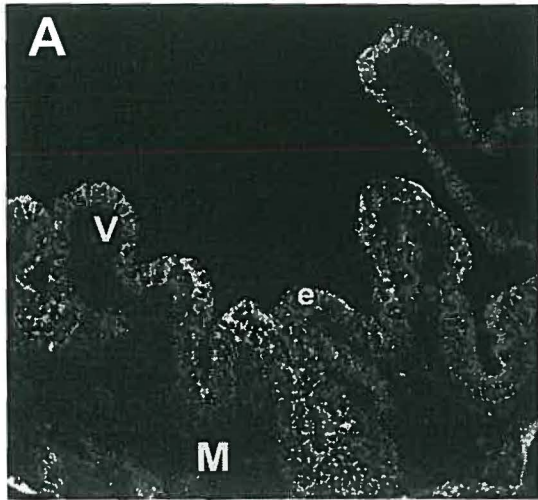
L'expression des homologues Bcl-2 le long de l'axe crypte-villosité du jéjunum, de l'iléon et du côlon a été étudiée au cours du développement fœtal de 9 à 14 semaines de gestation. Cet intervalle correspond à la formation des villosités de la paroi intestinale et l'épithélium se trouve déjà simple cylindrique (Ménard, 1989; Ménard et Beaulieu, 1994; Beaulieu, 1997). Tel qu'illustré à la Figure 4, nous observons que chez le jéjunum, tous les homologues étudiés sont exprimés dans tout l'épithélium dès 9 semaines. Ce marquage de l'épithélium plutôt homogène le long de l'axe intervillousité-villosité reste essentiellement le même durant tout le stade de développement 9-14 semaines de gestation. À ce stade, tous les homologues étudiés sont également exprimés dans tout l'épithélium chez l'iléon et le côlon.

3.1.2 Expression épithéliale des homologues Bcl-2 chez le jéjunum, l'iléon et le côlon fœtal humain de 15 à 17 semaines.

Au cours du stade du développement de 15 à 17 semaines de gestation, nous avons étudié l'expression des homologues Bcl-2 le long de l'axe crypte-villosité chez le jéjunum, l'iléon et le côlon. Ce stade de développement correspond à la formation des cryptes de la paroi intestinale (Ménard, 1989; Ménard et Beaulieu, 1994; Beaulieu, 1997). C'est également à partir de ce stade qu'une certaine compartimentalisation de l'expression épithéliale des

Figure 4. Localisation épithéliale des homologues Bcl-2 chez le jéjunum humain entre 9 et 14 semaines de gestation.

La détection de l'expression épithéliale des homologues Bcl-2 a été effectuée par immunofluorescence indirecte sur des coupes transversales de spécimens de jéjunum fœtaux humains âgés de 9 à 14 semaines de gestation. L'intervalle 9-14 semaines correspond à la formation des villosités (V) par infiltration de l'épithélium simple cylindrique (e) par le mésenchyme (M). Le marquage représentatif des homologues étudiés sont : Bag-1 A), Bad B), Mcl-1 C), Bax D), Bcl-2 E) et Bak F) à 9 (A), 10 (B), 12 (D), 13 (C) et 14 (E-F) semaines de gestation. Des résultats identiques ont été obtenus chez l'iléon et le côlon fœtal âgé de 9-14 semaines. L'étalon équivaut à 80 (C), 100 (A,B,D) et 125 (E et F) μm .



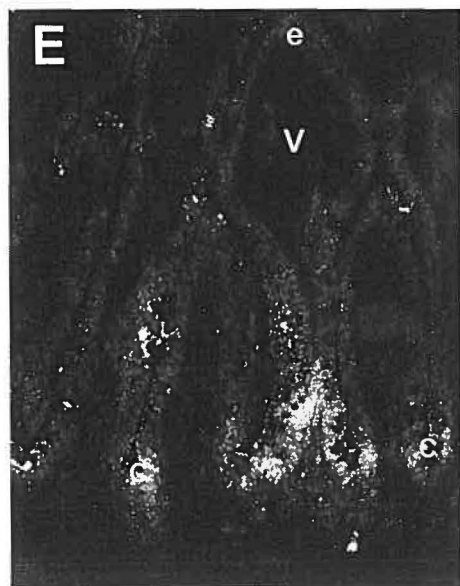
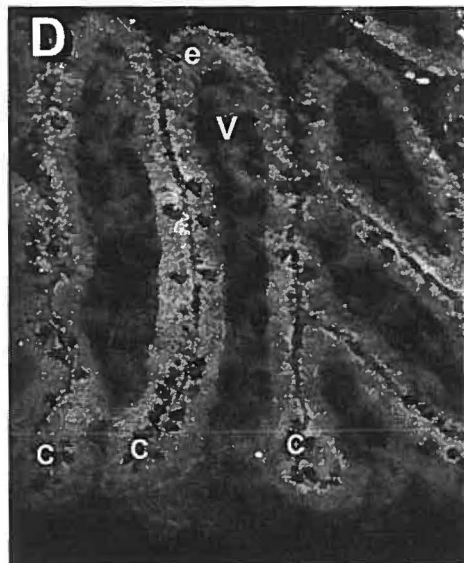
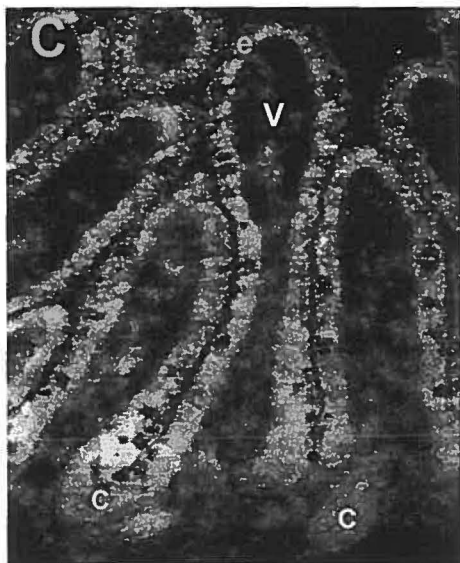
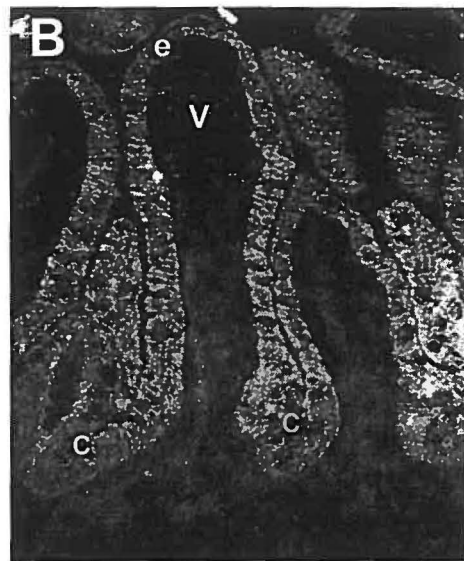
différents homologues Bcl-2 pro ou anti-apoptotiques se dessine. Ainsi, chez le jéjunum (Figure 5), l'expression de Mcl-1 et de Bak (Figure 5B et 5F respectivement) se trouve tout le long de l'axe crypte villosité, mais plus faiblement au niveau des cryptes en formation. Contrairement à Mcl-1 et Bak, Bcl-2 (Figure 5E) se trouve concentré au niveau des cryptes en formation. Cependant, pour Bax (Figure 5D), Bad (Figure 5C), Bag-1 (Figure 5A) et Bcl-X_L (résultat non montré) leurs distributions demeurent inchangées et se trouvent tout le long de l'axe crypte-villosité. Comme pour le jéjunum, le processus de compartimentalisation débute à ce stade chez l'iléon et le côlon mais avec des patrons d'expression différents comme on pourra le voir au stade 18 à 20 semaines de gestation.

3.1.3 Expression épithéliale des homologues Bcl-2 du jéjunum, de l'iléon et du côlon fœtal humain de 18 à 20 semaines.

L'expression des homologues Bcl-2 le long de l'axe crypte-villosité du jéjunum, de l'iléon et du côlon a finalement été étudiée au cours du développement fœtal au stade de 18 à 20 semaines de gestation (Figures 6, 7 et 8). Cet intervalle correspond à la maturation des cryptes et des villosités où la muqueuse intestinale ressemble structurellement et fonctionnellement à celle de l'intestin grêle adulte (Ménard, 1989; Ménard et Beaulieu, 1994; Beaulieu, 1997). C'est également à ce stade qu'une pleine compartimentalisation des homologues Bcl-2 étudiés est observée le long de l'axe crypte-villosité.

Figure 5. Localisation épithéliale des homologues Bcl-2 chez le jéjunum humain entre 15 et 17 semaines de gestation.

La détection de l'expression épithéliale des homologues Bcl-2 à été effectuée par immunofluorescence indirecte sur des coupes transversales de spécimens de jéjunum fœtaux humains âgés de 15 à 17 semaines de gestation. L'intervalle 15-17 semaines correspond à la formation des cryptes (c). Le marquage représentatif des homologues étudiés sont : Bag-1(A), Mcl-1(B), Bad(C), Bax(D), Bcl-2 (E) et Bak (F) à 15(A-B),16 (C-D) et 17 (E-F) semaines de gestation. L'échelle équivaut à 125µm (A à F).



Chez le jéjunum (Figure 6), Bcl-X_L (Figure 6A) et Bax (Résultat non montré) sont exprimés tout le long de l'axe crypte-villosité. Bad (Figure 6B) est exprimé dans l'épithélium tout le long de l'axe crypte-villosité mais plus fortement dans la moitié supérieure de la villosité ainsi qu'à la base de la villosité. Mcl-1 (Figures 6C) est fortement exprimé dans l'épithélium des villosités mais est absent des cryptes. Bak (Figure 6D) aussi est exprimé dans l'épithélium au niveau des villosités mais il l'est également très faiblement au niveau des cryptes. Bag-1 (Figure 6E) est exprimé de façon décroissante des cryptes aux villosités. Finalement, Bcl-2 (Figure 6F) est exprimé beaucoup plus faiblement que dans les stades précédents et présente également un gradient décroissant des cryptes aux villosités.

Chez l'iléon (Figure 7), Bcl-X_L (Figure 7A), Bag-1 (Figure 7C) Bcl-2 (Figure 7D) et Bak (Figure 7E) sont exprimés sous forme de gradient crypte-villosité décroissant. Contrairement, Mcl-1 (Figure 7B) est exprimé fortement au niveau des villosités et à l'apex, mais très faiblement exprimé au niveau des cryptes. Bax (Figure 7F) est fortement exprimé tout le long de l'axe crypte-villosité. Il est important de noter qu'à partir de 18 semaines de gestation le niveau d'expression de Bcl-2 devient très faible, tandis que celui de Bad est inférieur au niveau de détection.

Figure 6. Compartimentalisation épithéliale des homologues Bcl-2 chez le jéjunum humain à 18-20 semaines de gestation.

La détection de l'expression épithéliale des homologues Bcl-2 a été effectuée par immunofluorescence indirecte sur des coupes transversales de spécimens de jéjunum fœtaux humains âgés de 18 à 20 semaines de gestation. L'intervalle 18-20 semaines correspond à une muqueuse intestinale structurellement et fonctionnellement similaire à celle de l'adulte, où l'on peut voir notamment un épithélium simple cylindrique (e) disposé le long de villosités (V) et de cryptes (c) bien développées. Le marquage représentatif des homologues étudiés sont : Bcl-X_L (A), Bad (B), Mcl-1 (C), Bak (D), Bag-1 (E), et Bcl-2 (F) à 18 (A-B), 19 (E-F) et 20 (C-D) semaines de gestation. Notez qu'en (B) et (F) l'anticorps primaire a réagit avec les cellules de Gobelet des spécimens utilisés, que l'on remarque par des points brillants éparpillés le long de l'axe crypte-villosité. L'échelle équivalait à 90 (A-B) 100(E-F) et 125 (A à F) μm .

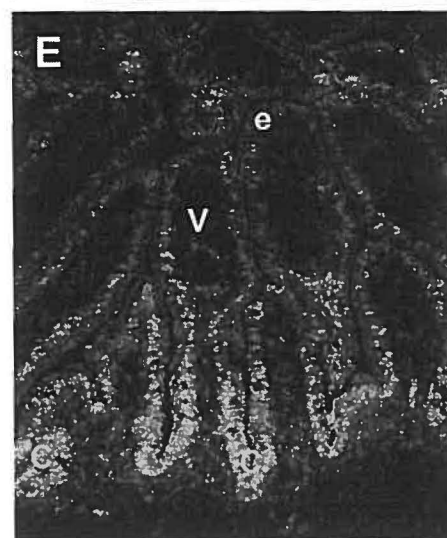
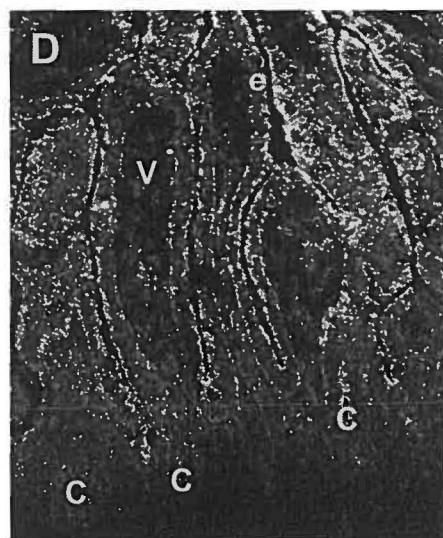
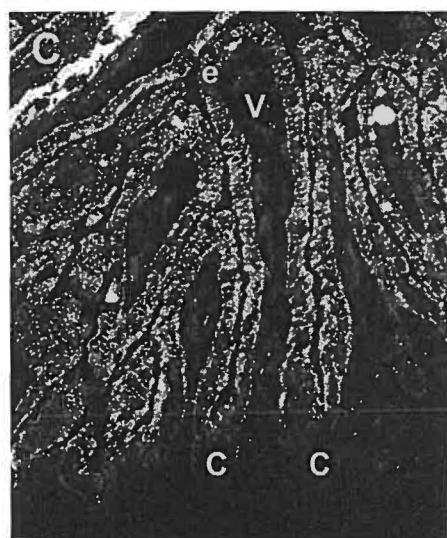
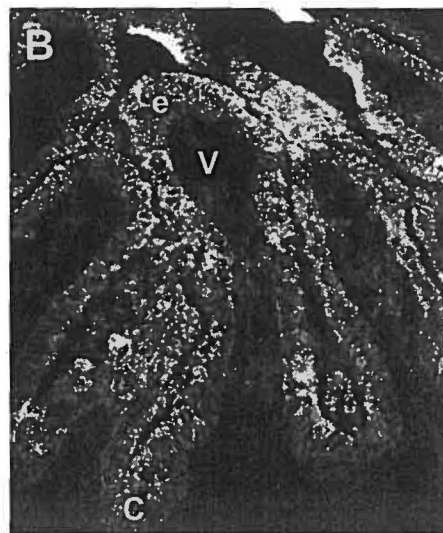
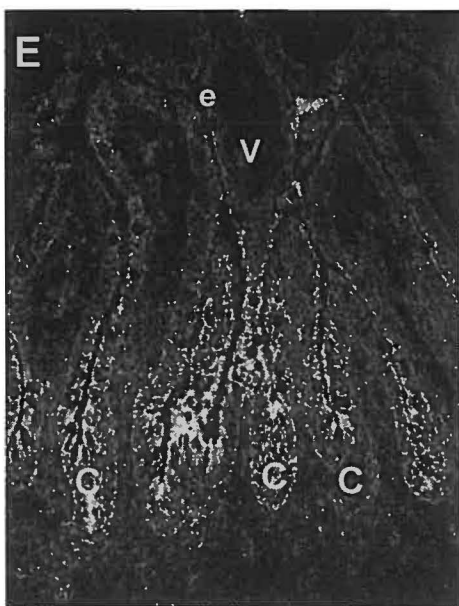
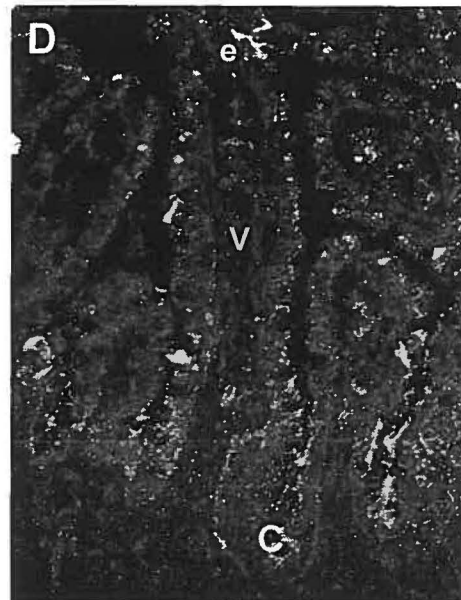
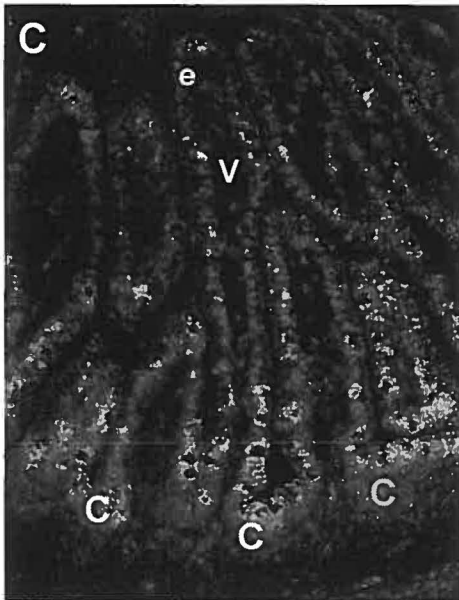
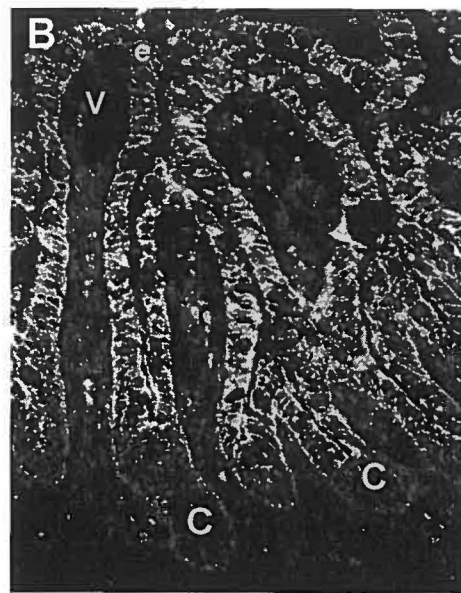
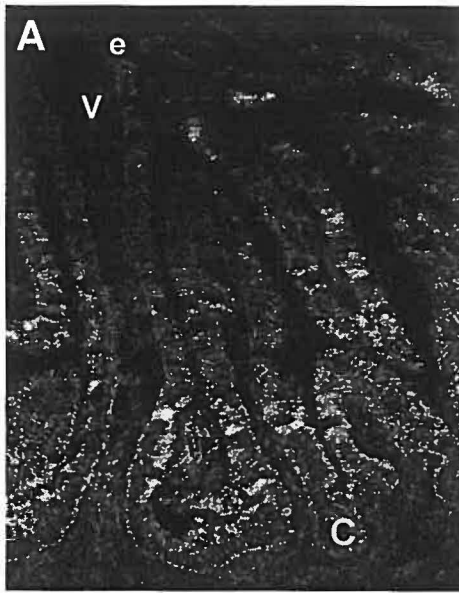


Figure 7. Compartimentalisation épithéliale des homologues Bcl-2 de l'iléon humain à 18-20 semaines de gestation.

La détection de l'expression épithéliale des homologues Bcl-2 a été effectuée par immunofluorescence indirecte sur des coupes transversales de spécimens d'iléon fœtaux humains âgés de 18 à 20 semaines. L'intervalle 18-20 semaines correspond à une muqueuse intestinale structurellement et fonctionnellement similaire à celle de l'adulte, où on peut voir notamment un épithélium simple cylindrique (e) disposé le long de villosités (V) et de cryptes (C) bien développées. Le marquage représentatif des homologues étudiés sont : Bcl-X_L (A), Mcl-1 (B), Bag-1 (C), Bcl-2 (D), Bak (E) et Bax (F) à 18 (B,F), 19 (A,D)' et 20 (C,E) semaines de gestation. Notez qu'en (A), (D) et (F) l'anticorps primaire a réagit avec les cellules de goblet et/ou les cellules à mucus des spécimens utilisés, que l'on remarque par des points brillants éparpillés le long de l'axe crypte-villosité. L'étalon équivaut à 90 (B,F), 100 (A,D), 125 (E, F) μm .



Chez le côlon (Figure 8), Bcl-X_L (Figure 8A) et Bak (Figure 8E) sont exprimés sous forme de gradient crypte-villosité légèrement décroissant. Contrairement, Mcl-1 (Figure 8B) est fortement exprimé tout le long de l'axe crypte-villosité mais plus faiblement à l'apex et à la base des cryptes. Finalement, Bag-1 (Figure 8C), Bcl-2 (Figure 8D) et Bax (Figure 8F) sont exprimés tout le long de l'axe crypte-villosité. Tout comme chez l'iléon, le niveau de détection de Bad est sous le niveau de détection (résultat non montré).

De plus, en rassemblant les résultats d'immunofluorescence (Figure 9), on remarque que les patrons d'expression des homologues Bcl-2 sont différentiels non seulement le long de l'axe crypte-villosité mais également différentiels entre les segments. Effectivement :

Pour les pro-apoptotiques, Bax est exprimé tout le long de l'axe crypte-villosité dans tous les segments (Figures 7F et 8F). Chez le jéjunum, l'expression de Bak (Figure 6D) se trouve dans tout l'épithélium de la villosité mais faiblement exprimé au niveau des cryptes. Chez l'iléon, l'expression de Bak (Figure 7E) est plus faible et se trouve sous forme de gradient crypte-villosité décroissant. Chez le côlon, l'expression de Bak (Figure 8E) est plus importante que chez l'iléon mais est encore exprimée sous forme de gradient crypte-villosité décroissant. Chez le jéjunum, l'expression de Bad (Figure 6B) se trouve principalement dans la moitié supérieure et à la base des villosités.

Figure 8. Compartimentalisation épithéliale des homologues Bcl-2 du côlon humain à 18-20 semaines de gestation.

La détection de l'expression épithéliale des homologues Bcl-2 a été effectuée par immunofluorescence indirecte sur des coupes transversales de spécimens de côlon fœtaux humains âgés de 18 à 20 semaines. L'intervalle 18-20 semaines correspond à une muqueuse intestinale structurellement et fonctionnellement similaire à celle de l'adulte, où l'on peut voir notamment un épithélium simple cylindrique (e) disposé le long de villosités (V) et de cryptes (C) bien développées. Le marquage représentatif des homologues étudiés sont : Bcl-X_L (A), Mcl-1 (B), Bag-1 (C), Bcl-2 (D), Bak (E) et Bax (F) à 18 (A,B), 19 (C,D) et 20 (E,F) semaines de gestation. Notez en (D) que l'anticorps primaire a réagit avec les cellules de goblet et/ou les cellules à mucus des spécimens utilisés, que l'on remarque par des points brillants éparpillés le long de l'axe crypte-villosité. L'étalon équivaut à 100µm.

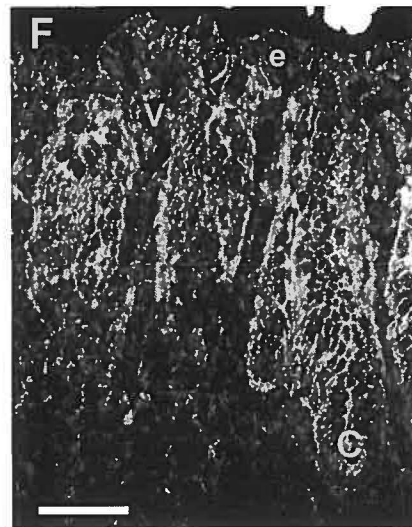
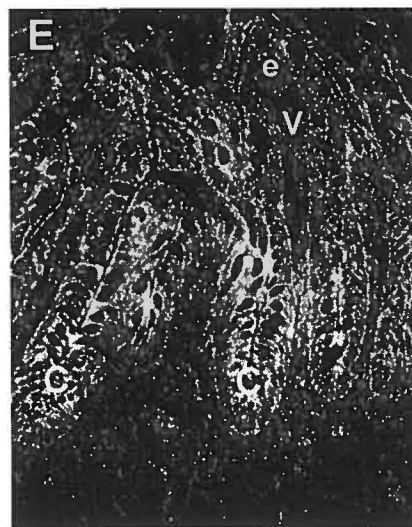
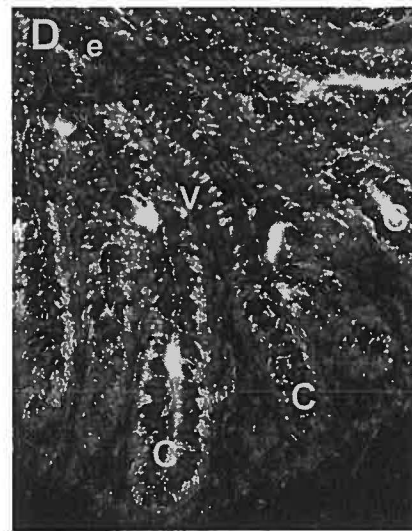
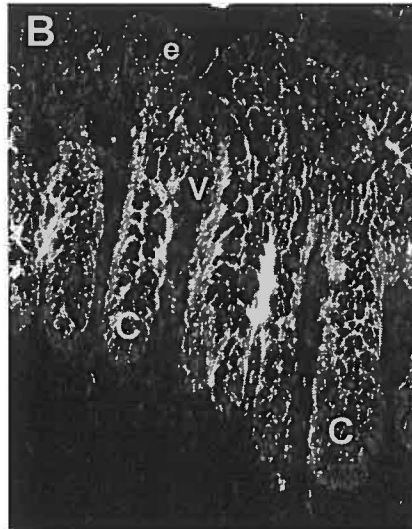
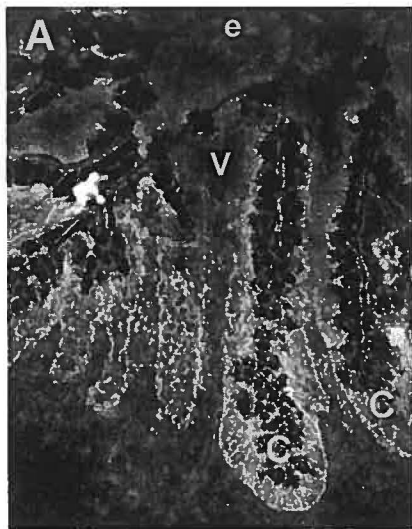
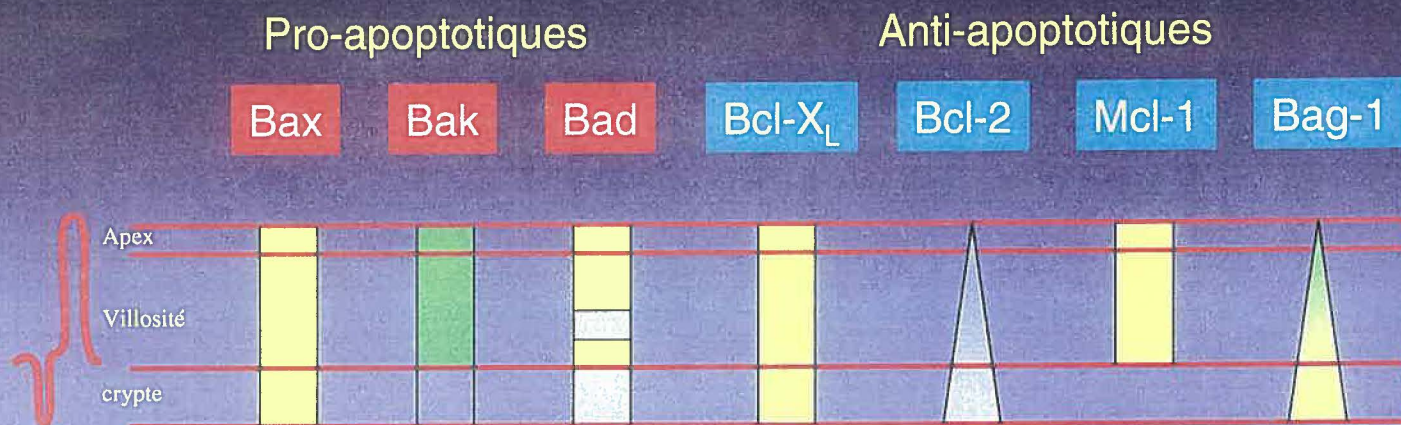


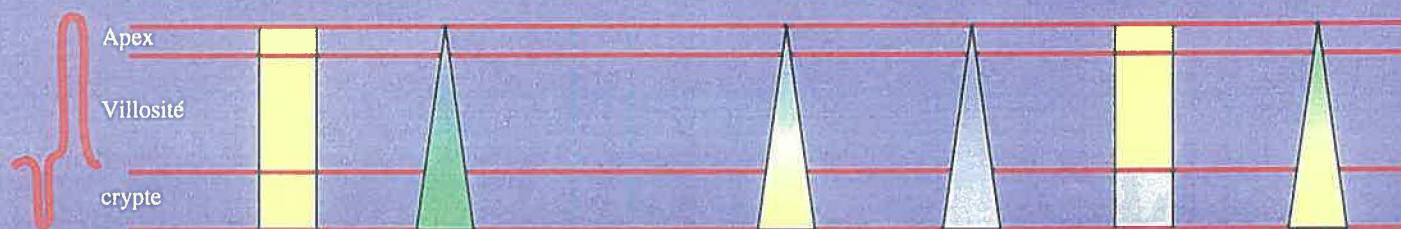
Figure 9. Compartimentalisation épithéliale des homologues Bcl-2 du jéjunum, de l'iléon et du côlon fœtal humain à 18-20 semaines de gestation : schéma récapitulatif.

Représentation de l'expression épithéliale des homologues Bcl-2 pro-apoptotiques (Bax, Bak et Bad) et anti-apoptotiques (Bcl-X_L, Bcl-2, Mcl-1 et Bag-1) , au niveau de l'axe crypte-villosité chez le jéjunum, l'iléon et le côlon fœtal humain, au stade 18 à 20 semaines de gestation. Les immunofluorescences qui ont été présentées aux figures (6-8) sont schématisées ici en expression relative d'intensité allant de très faible (bleu foncé) à faible (bleu clair), moyen (vert foncé) et fort (vert clair). Quelques homologues présentent un gradient d'expression décroissant des cryptes aux villosités (gradient pointu vert et bleu) et, à 18-20 semaines, Bad est non détectable (pointillé bleu) pour l'iléon et le côlon.

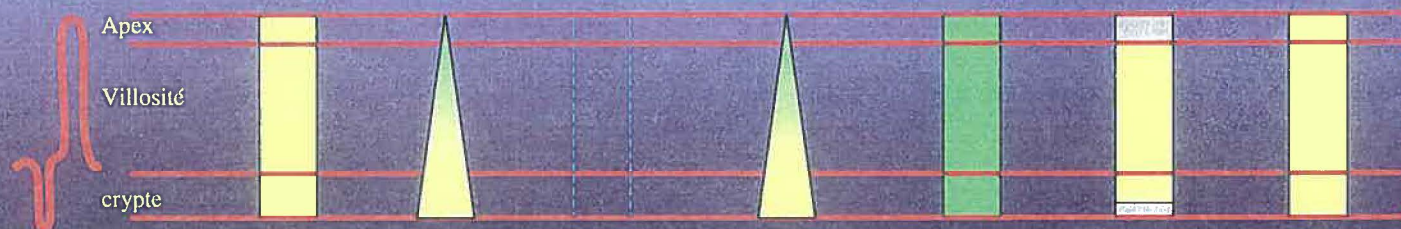
Jéjunum



Iléon



Côlon



Légende:

Non détectable

Très faible

Faible

Moyen

Fort

Gradients

Chez l'iléon et le côlon, les niveaux d'expression de Bad sont toutefois sous le seuil de détection.

Pour les anti-apoptotiques, on remarque que Bcl-X_L est fortement exprimé tout le long de l'axe crypte villosité chez le jéjunum (Figure 6A), tandis que chez l'iléon et le côlon son expression forme un gradient crypte-villosité décroissant (Figures 7A et 8A). Chez le jéjunum et l'iléon, l'expression de Bcl-2 est faible et se retrouve sous forme de gradient crypte-villosité décroissant (Figures 6F et 7D); cependant, chez le colon, Bcl-2 est exprimé plus fortement que dans les autres segments et se trouve dans tout l'épithélium uniformément (Figure 8D). Mcl-1 est fortement exprimé au niveau des villosités et à l'apex chez le jéjunum et l'iléon (Figure 6C et 7B); toutefois, Mcl-1 n'est pas exprimé au niveau des cryptes chez le jéjunum (Figure 6C) tandis que chez l'iléon il y est faiblement exprimé (Figure 7B). Chez le côlon, Mcl-1 est exprimé fortement dans tout l'épithélium mais plus faiblement à l'apex des villosités et à la base des cryptes (Figure 8B). Bag-1 est exprimé fortement et selon un gradient crypte-villosité décroissant chez le jéjunum et l'iléon (Figure 6E et 7C); chez le côlon, Bag-1 est exprimé fortement dans tout l'épithélium (Figure 8C).

3.2 Niveaux d'expression des homologues Bcl-2 chez le jéjunum, l'iléon et le côlon foetal humain au cours du développement.

Les niveaux d'expression des homologues Bcl-2 pro-apoptotique Bax, Bak, Bad et anti-apoptotiques Bcl-2, Mcl-1, Bcl-X_L ainsi que la protéine

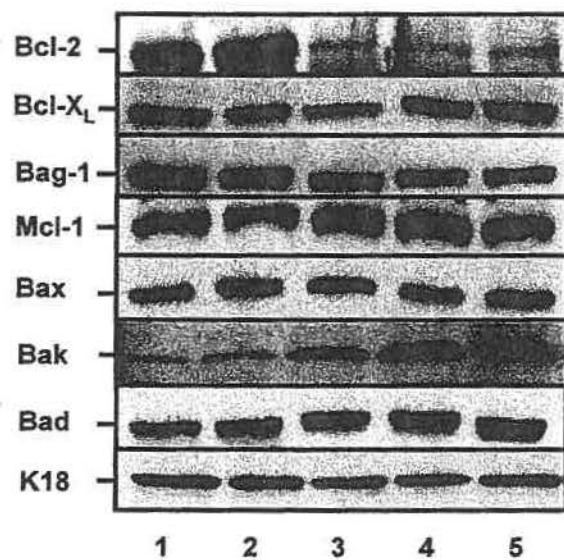
associée anti-apoptotique Bag-1 ont été étudiés. Pour ce faire, nous avons utilisé la méthode Western blot sur des homogénats de jéjunum (10-20 semaines), d'iléon et de côlon (12-20 semaines) fœtal humain, à l'aide d'anticorps monoclonaux et polyclonaux spécifiques (voir Tableau II). Comme nous allons le voir dans les sections suivantes, les niveaux d'expression des homologues Bcl-2 subissent des variations parallèlement au développement fœtal de l'intestin entre 10 et 20 semaines de gestation.

3.2.1 Niveaux d'expression des homologues Bcl-2 chez le jéjunum au cours du développement fœtal humain (10-20 semaines).

Nous avons tout d'abord vérifié l'expression des homologues Bcl-2 et de la protéine associée Bag-1 dans le jéjunum au cours du développement. L'analyse immunoblot des lysats provenant du grattage de la muqueuse du jéjunum au cours du développement démontre la présence de toutes les protéines étudiées (Figure 10). On remarque alors que Bcl-2 (~26k Da), Bcl-X_L (~28-30 kDa), Bag-1 (~32-34 kDa), Mcl-1 (~39-42 kDa), Bax (~21 kDa), Bak (~25-28 kDa) et Bad (~28-32 kDa) sont présents à tous les stades de développement et migrent à leur poids moléculaire relatif précédemment déterminé (Krajewski et al., 1994a-c, 1995; Takayama et al., 1995; Krajewska et al., 1996; Krajewski et al., 1996; Packham et al., 1997; Adams et Cory, 1998; Metcalfe et al., 1999).

Figure 10. Niveaux d'expression des homologues Bcl-2 au cours du développement du jéjunum humain.

Analyses Western blot représentatives des niveaux d'expression de Bcl-2, Bcl-X_L, Bag-1, Mcl-1, Bax, Bak, Bad et cytokératine 18 (K18) provenant du grattage de la muqueuse du jéjunum humain foetal à 10-12 (ligne 1), 13-14 (ligne 2), 15-16 (ligne 3), 17-18 (ligne 4) et 19-20 (ligne 5) semaines de gestation. Un total de 50 µg/puits de protéine ont été séparés par SDS-15% PAGE avec conditions réductrices, électrotransférés sur des membranes de nitrocellulose, puis sondés avec des anticorps spécifiques pour la détection de Bcl-2 (~26 kDa), Bcl-X_L (~28-30 kDa), Bag-1 (~32-34 kDa), Mcl-1 (~39-42 kDa), Bax (~21 kDa), Bak (~25-28 kDa) ou Bad (~28-32 kDa). La détection de K18 (~50-55 kDa) a été utilisée comme contrôle des quantités de protéines analysées pour chaque intervalle d'âge développemental.



Nous avons par la suite vérifié les variations des niveaux d'expression épithéliale des homologues Bcl-2 et de Bag-1 au cours du développement. L'expression relative de ces protéines a été évaluée en comparaison avec une protéine épithéliale de référence, la cytokératine 18 (K18). Les données densitométriques pour les anti-apoptotiques étudiés sont présentées à la Figure 11. Ces données indiquent que les niveaux d'expression de Bcl-2 (Figure 11A) augmentent significativement et atteignent un maximum à 13-14 semaines par rapport à 10-12 semaines. Ces niveaux d'expression diminuent ensuite à 15-16 semaines et restent faibles jusqu'à 19-20 semaines. On observe également une diminution générale des niveaux d'expression de Bcl-2 entre 10-12 et 19-20 semaines. Les niveaux d'expression de Bcl-X_L (Figure 11B), diminuent graduellement jusqu'à 15-16 semaines. Ces niveaux d'expression augmentent par la suite à 17-18 semaines et demeurent élevés jusqu'à 19-20 semaines, augmentation qui est significative par rapport à 15-16 semaines. Il n'y a donc pas de changement significatif des niveaux d'expression de Bcl-X_L entre 10-12 semaines et 19-20 semaines. Les niveaux d'expression de Bag-1 (Figure 11C) diminuent graduellement au cours du développement de 10 à 20 semaines, cette diminution est significative entre les stades 10-12 semaines et 19-20 semaines. Contrairement, les niveaux d'expression de Mcl-1 (Figure 11D) augmentent graduellement de 10 à 20 semaines; cette augmentation est significative entre les stades 10-12 semaines et 19-20 semaines.

Les données densitométriques pour les pro-apoptotiques étudiés sont présentées à la Figure 12. On voit ici que les niveaux d'expression de Bax

Figure 11. Niveaux d'expression relatifs des homologues Bcl-2 anti-apoptotiques au cours du développement du jéjunum fœtal humain

Niveaux d'expression relatifs de Bcl-2 (A), Bcl-X_L (B), Bag-1 (C) et Mcl-1 (D) au cours du développement du jéjunum humain, en comparaison à la cytokératine 18 (K18). Les protéines totales provenant du grattage de la muqueuse ont été séparées et sondées comme présenté à la Figure 10, puis analysées par densitométrie au laser. La densité totale des points de l'aire (AU x mm) a été déterminée pour chaque protéine analysée à 10-12, 13-14, 15-16, 17-18 et 19-20 semaines de gestation (post-fertilisation), afin d'établir les profils des ratios BCL-2/K18 (A), Bcl-X_L/K18 (B), Bag-1/K18 (C), Mcl-1/K18 (D). Chaque colonne représente la moyenne \pm ESM d'au moins trois différents spécimens ($n \geq 3$) analysés par stade de développement. Les différences statistiquement significatives ($0.001 \leq p \leq 0.05$) déterminées par le test *t* de Student sont notées par un astérisque (*).

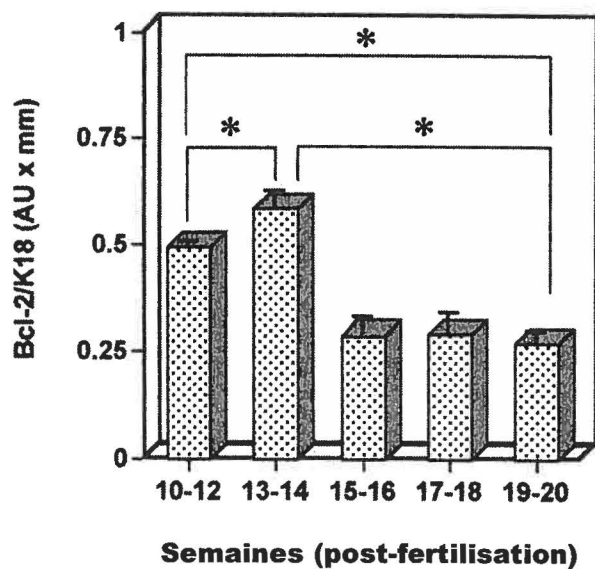
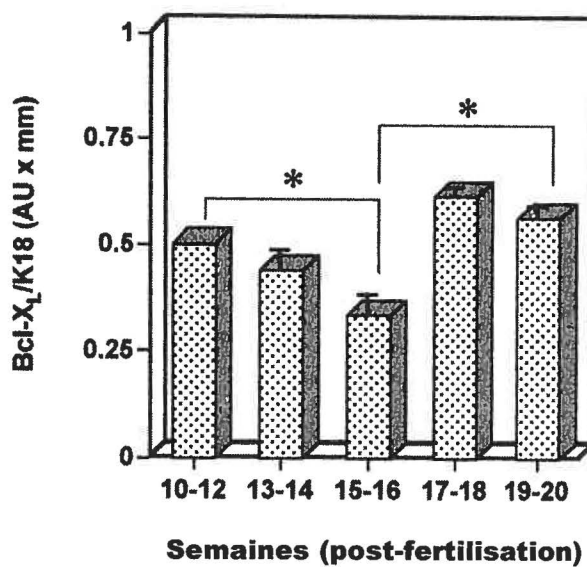
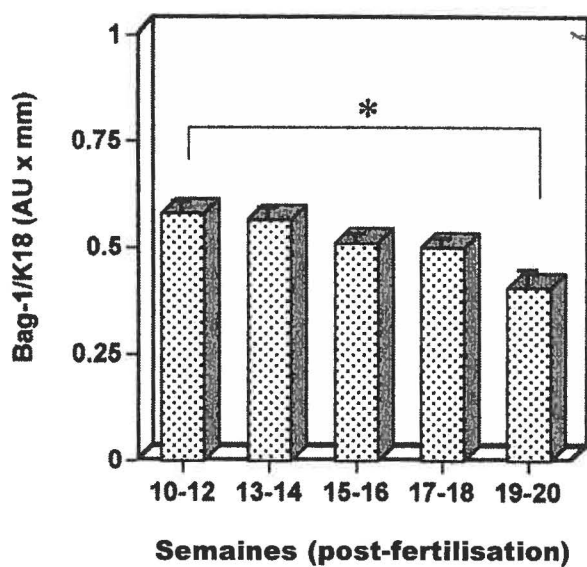
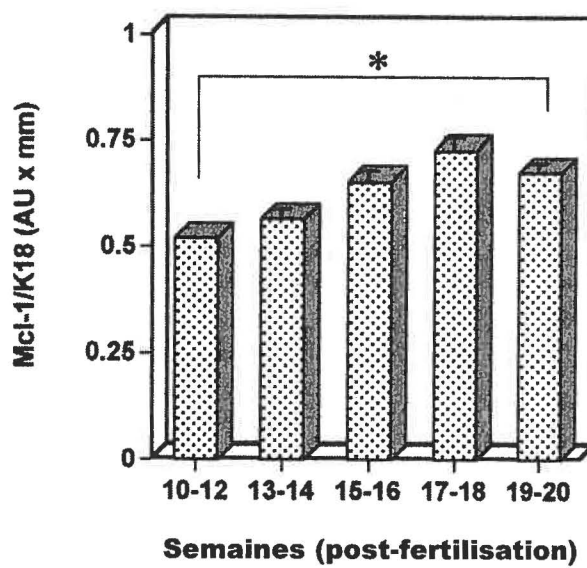
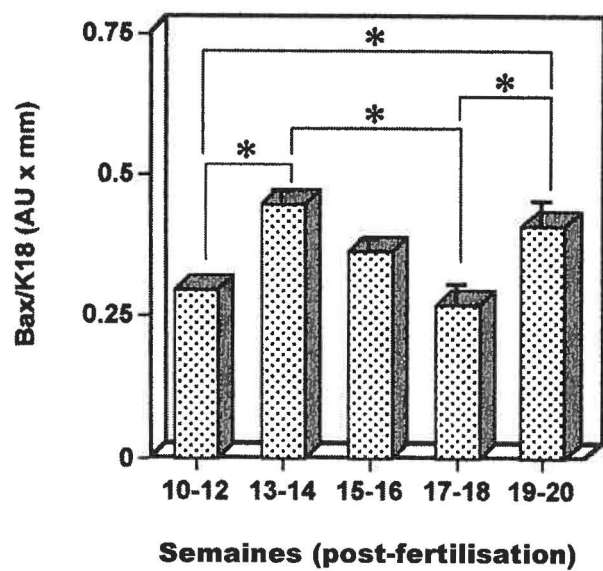
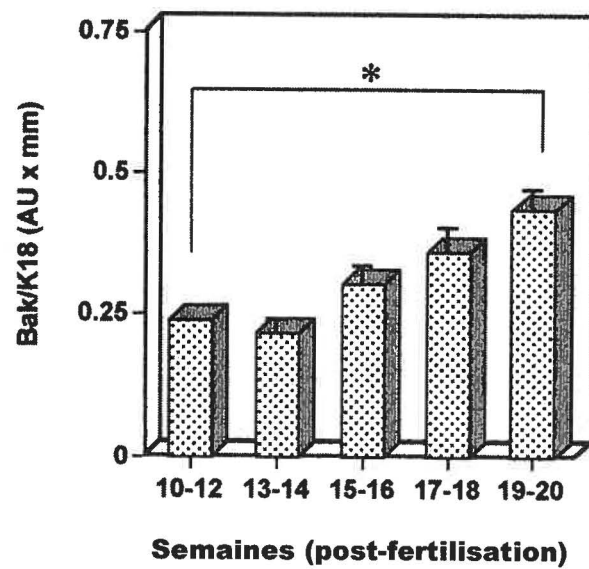
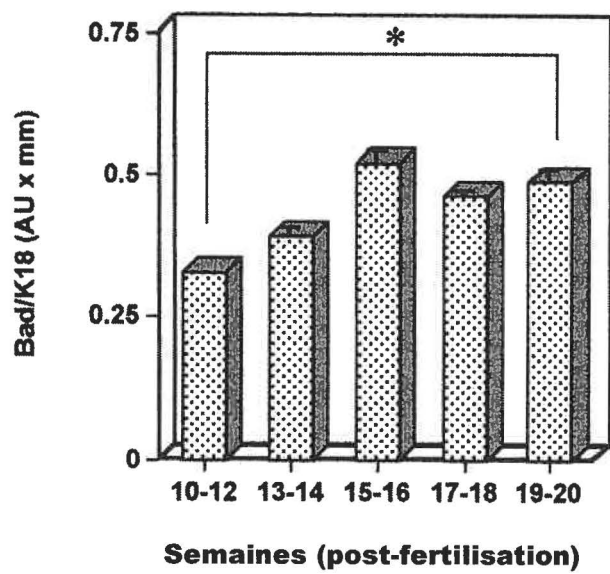
A**B****C****D**

Figure 12. Niveaux d'expression relatifs des homologues Bcl-2 pro-apoptotiques au cours du développement du jéjunum fœtal humain

Niveaux d'expression relatifs de Bax (A), Bak (B) et Bad (C) au cours du développement du jéjunum humain, en comparaison à la cytokératine 18 (K18). Les protéines totales provenant du grattage de la muqueuse ont été séparées et sondées comme présenté à la Figure 10, puis analysées par densitométrie au laser. La densité totale des points de l'aire (AU x mm) a été déterminée pour chaque protéine analysée à 10-12, 13-14, 15-16, 17-18 et 19-20 semaines de gestation (post-fertilisation), afin d'établir les profils des ratios Bax/K18 (A), Bak/K18 (B) et Bad/K18 (C). Chaque colonne représente la moyenne \pm ESM d'au moins trois différents spécimens ($n \geq 3$) analysés par stade de développement. Les différences statistiquement significatives ($0.001 \leq p \leq 0.05$) déterminées par le test *t* de Student sont notées par un astérisque (*).

A**B****C**

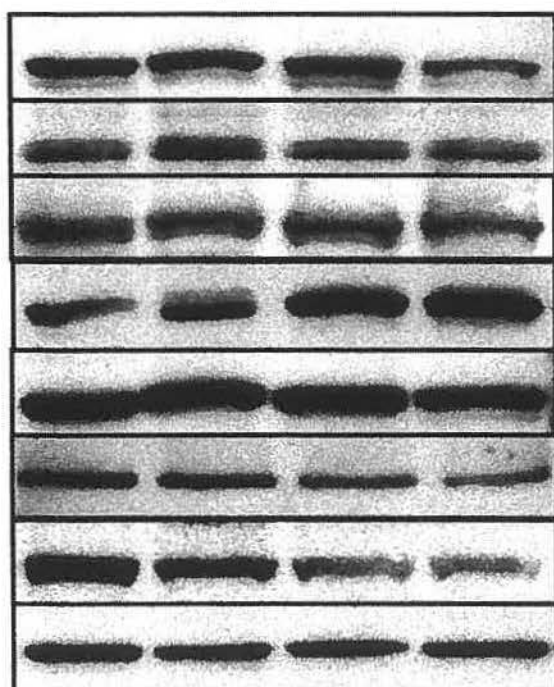
(Figure 12A) varient beaucoup au cours du développement. Tout d'abord, les niveaux d'expression de Bax augmentent significativement à 13-14 semaines par rapport à ce qu'ils étaient à 10-12 semaines. Par la suite, ces niveaux d'expression redescendent graduellement jusqu'à 17-18 semaines rejoignant des valeurs semblables à 10-12 semaines; cette diminution des niveaux d'expression entre 13-14 semaines et 17-18 semaines est significative. Finalement, les niveaux d'expression de Bax remontent significativement à 19-20 semaines par rapport à 17-18 semaines, rejoignant des valeurs semblables à celles de 13-14 semaines. On note donc une augmentation globale significative des niveaux d'expression de Bax entre 10-12 semaines et 19-20 semaines. Les niveaux d'expression de Bak (Figure 12B) et Bad (Figure 12C) augmentent significativement et graduellement de 10 à 20 semaines à 19-20 semaines.

3.2.2 Niveaux d'expression des homologues Bcl-2 chez l'iléon au cours du développement fœtal humain (12-20 semaines).

Nous avons tout d'abord vérifié l'expression des homologues Bcl-2 anti-apoptotiques et de la protéine associée Bag-1 chez l'iléon au cours du développement. L'analyse immunoblot des lysats provenant du grattage de la muqueuse de l'iléon au cours du développement démontre la présence de toutes les protéines étudiées (Figure 13A). On remarque alors que tous les homologues ainsi que Bag-1 sont présents à tous les stades de développement et migrent à leur poids moléculaire relatif précédemment déterminé. Les

Figure 13. Niveaux d'expression des homologues Bcl-2 au cours du développement de l'iléon et du côlon humain.

Analyses Western blot représentatives des niveaux d'expression de Bcl-2, Bcl-X_L, Bag-1, Mcl-1, Bax, Bak, Bad et cytokératine 18 (K18) provenant du grattage de la muqueuse de l'iléon (A) et du côlon (B) humain fœtal à 12-14 (ligne 1), 15-16 (ligne 2), 17-18 (ligne 3) et 19-20 (ligne 4) semaines de gestation. Un total de 50 µg/puits de protéines ont été séparés par SDS-15% PAGE avec conditions réductrices, électrotransférés sur des membranes de nitrocellulose, puis sondés avec des anticorps spécifiques pour la détection de Bcl-2 (~26 kDa), Bcl-X_L (~28-30 kDa), Bag-1 (~32-34 kDa), Mcl-1 (~39-42 kDa), Bax (~21 kDa), Bak (~25-28 kDa) ou Bad (~28-32 kDa). La détection de K18 (~50-55 kDa) a été utilisée comme contrôle des quantités de protéines analysées pour chaque intervalle d'âge développemental.

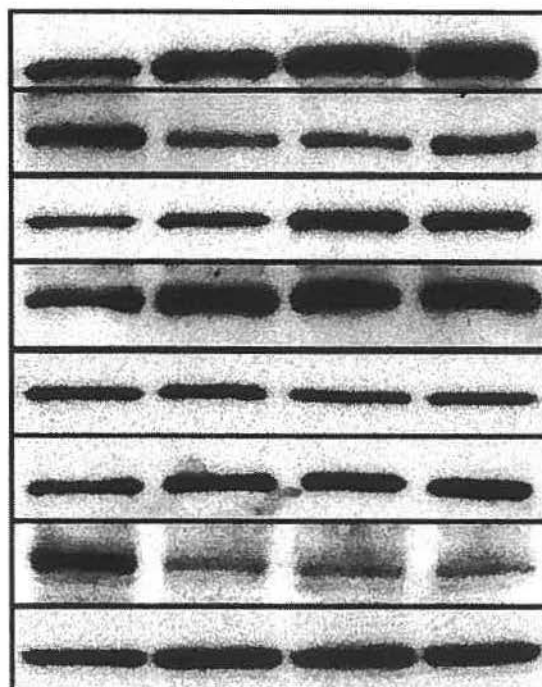
AIléon

1

2

3

4

BCôlon

1

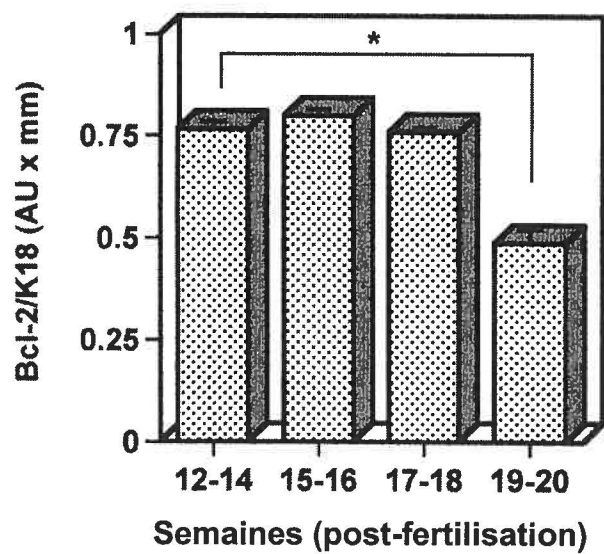
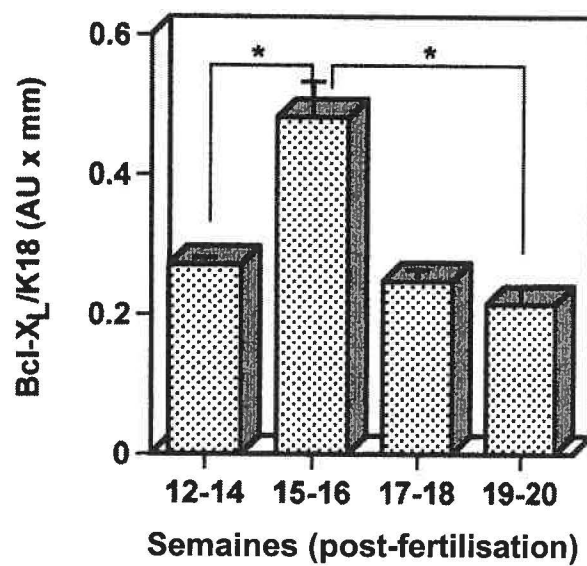
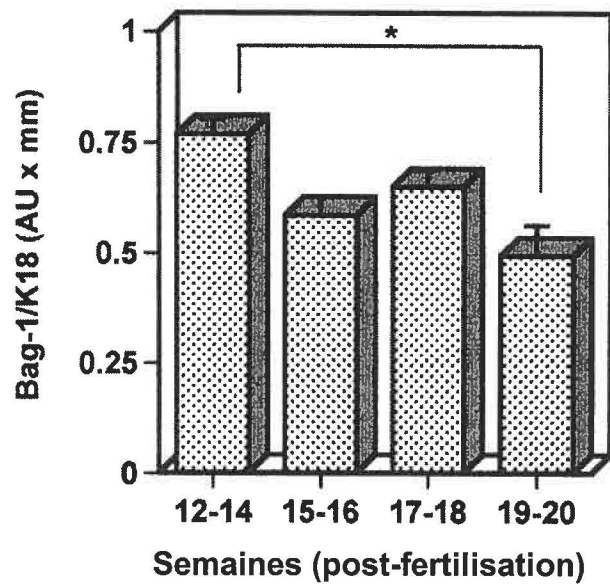
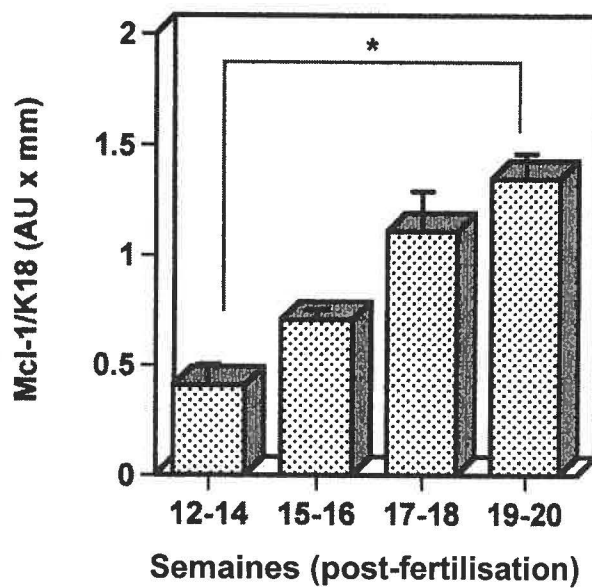
2

3

4

Figure 14. Niveaux d'expression relatifs des homologues Bcl-2 anti-apoptotiques au cours du développement de l'iléon fœtal humain

Niveaux d'expression relatifs de Bcl-2 (A), Bcl-X_L (B), Bag-1 (C) et Mcl-1 (D) au cours du développement du jéjunum humain, en comparaison à la cytokératine 18 (K18). Les protéines totales provenant du grattage de la muqueuse ont été séparées et sondées comme présenté à la Figure 10, puis analysées par densitométrie au laser. La densité totale des points de l'aire (AU x mm) a été déterminée pour chaque protéines analysées à 10-12, 13-14, 15-16, 17-18 et 19-20 semaines de gestation (post-fertilisation), afin d'établir les ratios BCL-2/K18 (A), Bcl-X_L/K18 (B), Bag-1/K18 (C), Mcl-1/K18 (D). Chaque colonne représente la moyenne \pm ESM d'au moins trois différents spécimens (n \geq 3) analysés par stade de développement. Les différences statistiquement significatives ($0.001 \leq p \leq 0.05$) déterminées par le test *t* de Student sont notées par un astérisque (*).

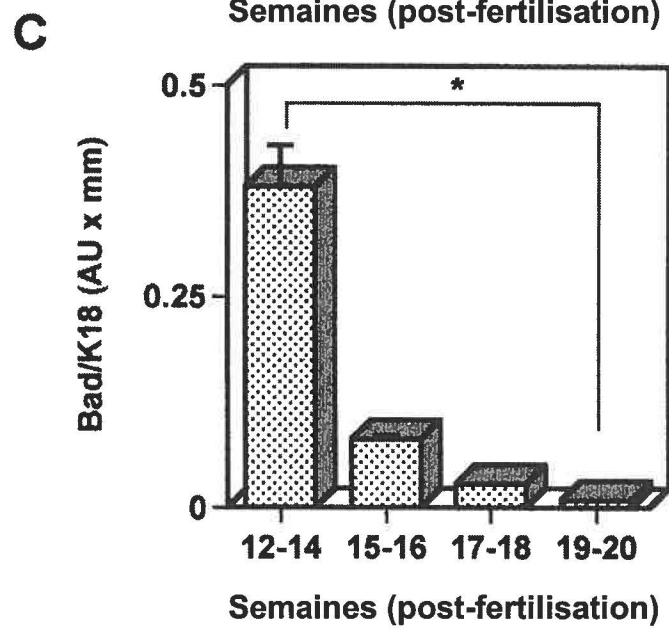
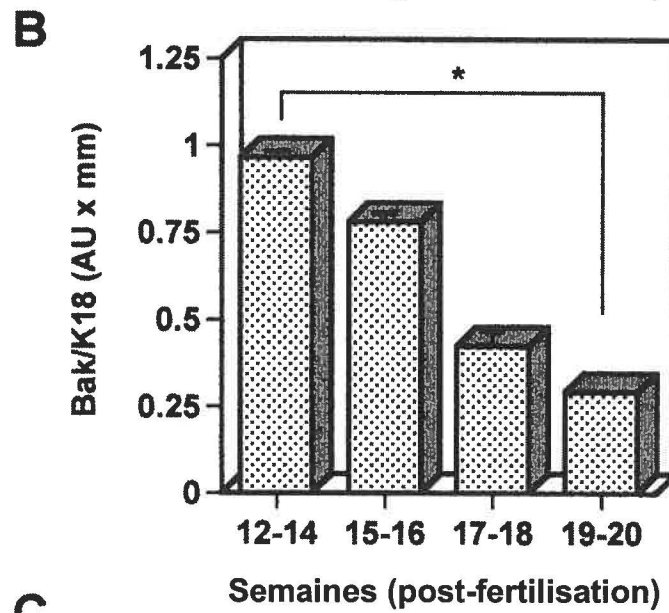
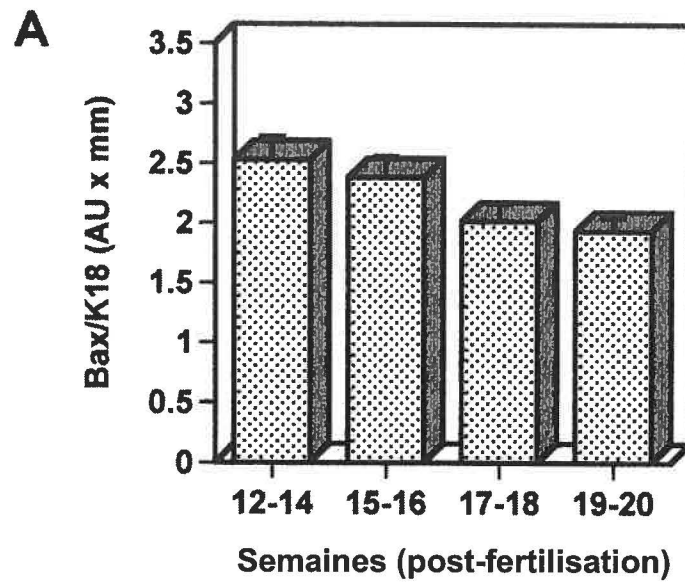
A**B****C****D**

données densitométriques pour les anti-apoptotiques étudiés sont présentées à la Figure 14. Ces résultats indiquent que les niveaux d'expression de Bcl-2 (Figure 14A) sont élevés de 12-14 semaines à 17-18 semaines et chutent à 19-20 semaines, les niveaux d'expression de 19-20 semaines sont significativement inférieurs à ceux de 12-14 semaines. Les niveaux d'expression de Bcl-X_L (Figure 14B) demeurent stables entre 12-14 semaines et 19-20 semaines à l'exception d'une augmentation à 15-16 semaines. Les niveaux d'expression de Bcl-X_L à 15-16 semaines sont significativement plus élevés que ceux de 12-14 semaines et 19-20 semaines. Pour Bag-1 (Figure 14C), on note une diminution significative et graduelle de ses niveaux d'expression entre 12-14 semaines et 19-20 semaines. Les niveaux d'expression de Mcl-1 (Figure 14D) à 19-20 semaines sont significativement supérieurs à ceux de 12-14 semaines et on note que ces niveaux d'expression augmentent graduellement entre 12 et 20 semaines.

Les données densitométriques pour les pro-apoptotiques étudiés sont présentées à la Figure 15. Ces résultats indiquent que les niveaux d'expression de Bax (Figure 15A) restent relativement stables même si on note une légère diminution globale non significative. Pour les niveaux d'expression de Bak (Figure 15B), on observe une diminution graduelle qui est significative entre 12-14 semaines et 19-20 semaines. Enfin, les niveaux d'expression de Bad (Figure 15C) chutent à 15-16 semaines par rapport à ce qu'ils étaient à 12-14 semaines. Ces niveaux d'expression continuent de diminuer jusqu'à 19-20

Figure 15. Niveaux d'expression relatifs des homologues Bcl-2 pro-apoptotiques au cours du développement de l'iléon fœtal humain

Niveaux d'expression relatifs de Bax (A), Bak (B) et Bad (C) au cours du développement du jéjunum humain, en comparaison à la cytokératine 18 (K18). Les protéines totales provenant du grattage de la muqueuse ont été séparées et sondées comme présenté à la Figure 10, puis analysées par densitométrie au laser. La densité totale des points de l'aire (AU x mm) a été déterminée pour chaque protéine analysée à 10-12, 13-14, 15-16, 17-18 et 19-20 semaines de gestation (post-fertilisation), afin d'établir les ratios Bax/K18 (A), Bak/K18 (B) et Bad/K18 (C). Chaque colonne représente la moyenne \pm ESM d'au moins trois différents spécimens ($n \geq 3$) analysés par stade de développement. Les différences statistiquement significatives ($0.001 \leq p \leq 0.05$) déterminées par le test *t* de Student sont notées par un astérisque (*).



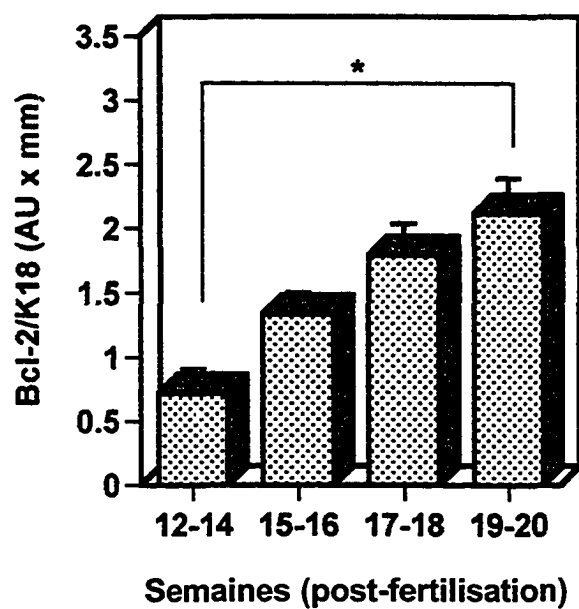
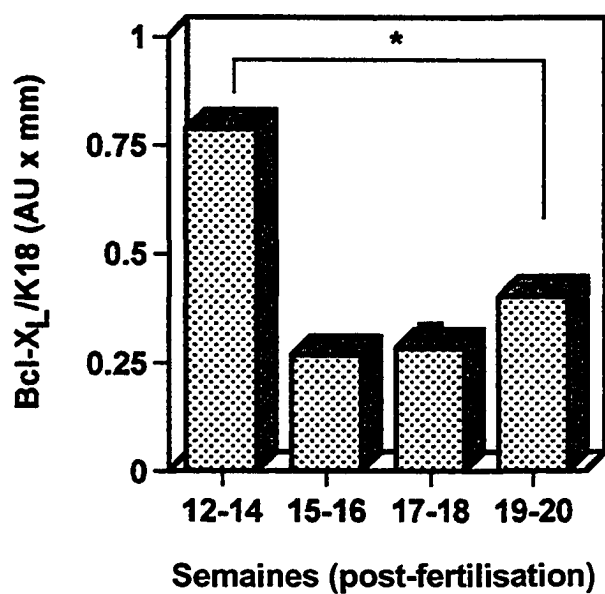
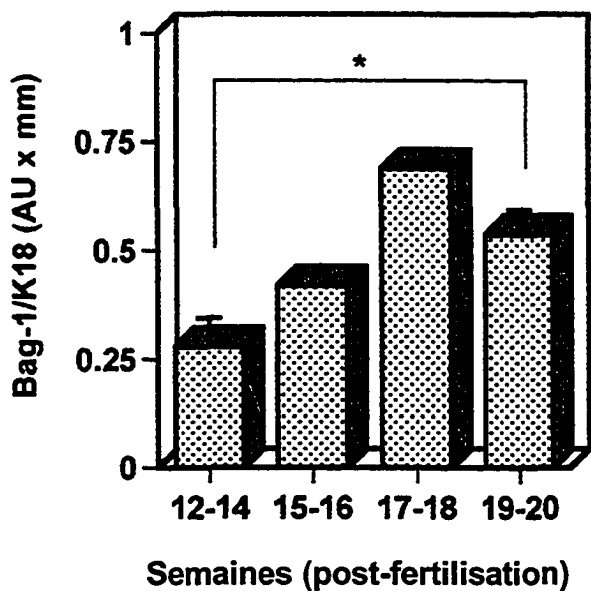
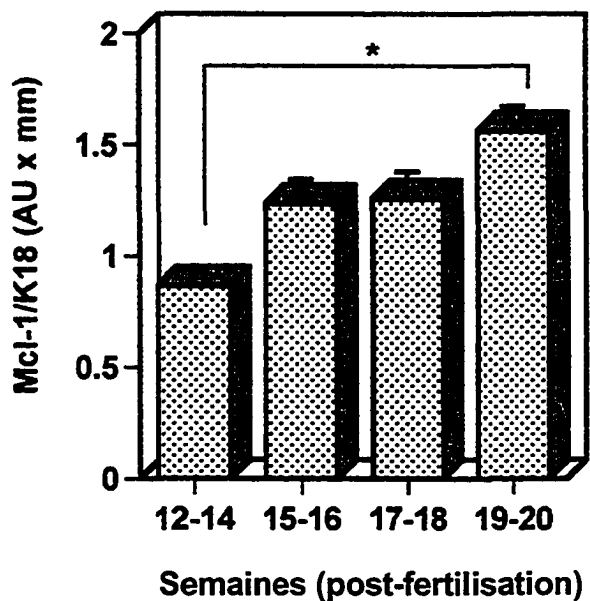
semaines, on observe donc de façon générale une chute significative des niveaux d'expression de Bad entre 12-14 semaines et 19-20 semaines.

3.2.3 Niveaux d'expression des homologues Bcl-2 chez le côlon au cours du développement fœtal humain (12-20 semaines).

Nous avons tout d'abord vérifié l'expression des homologues Bcl-2 anti-apoptotiques et de la protéine associée Bag-1 dans le côlon au cours du développement. L'analyse immunoblot des lysats provenant du grattage de la muqueuse du côlon au cours du développement démontre la présence de toutes les protéines étudiées (Figure 13B). On remarque alors que tous les homologues ainsi que Bag-1 sont présents à tous les stades de développement et migrent à leur poids moléculaire relatif précédemment déterminé. Les données densitométriques pour les anti-apoptotiques étudiés sont présentées à la Figure 16. Ces résultats indiquent que les niveaux d'expression de Bcl-2 (Figure 16A) augmentent significativement et graduellement de 12-14 semaines à 19-20 semaines. Pour les niveaux d'expression de Bcl-X_L (Figure 16B), on observe une diminution significative des niveaux d'expression de Bcl-X_L entre 12-14 semaines et 19-20 semaines. Les niveaux d'expression de Bag-1 (Figure 16C) augmentent graduellement de 12-14 semaines à 17-18 semaines et ces niveaux redescendent à 19-20 semaines. On observe globalement une augmentation significative des niveaux d'expression de Bag-1 entre 12-14 semaines et 19-20 semaines. Les niveaux d'expression de Mcl-1 (Figure 16D)

Figure 16. Niveaux d'expression relatifs des homologues Bcl-2 anti-apoptotiques au cours du développement du côlon fœtal humain

Niveaux d'expression relatifs de Bcl-2 (A), Bcl-X_L (B), Bag-1 (C) et Mcl-1 (D) au cours du développement du jéjunum humain, en comparaison à la cytochrome 18 (K18). Les protéines totales provenant du grattage de la muqueuse ont été séparées et sondées comme présenté à la Figure 10, puis analysées par densitométrie au laser. La densité totale des points de l'aire (AU x mm) a été déterminée pour chaque protéines analysées à 10-12, 13-14, 15-16, 17-18 et 19-20 semaines de gestation (post-fertilisation), afin d'établir les profils des ratios BCL-2/K18 (A), Bcl-X_L/K18 (B), Bag-1/K18 (C), Mcl-1/K18 (D). Chaque colonne représente la moyenne \pm ESM d'au moins trois différents spécimens ($n \geq 3$) analysés par stade de développement. Les différences statistiquement significatives ($0.001 \leq p \leq 0.05$) déterminées par le test *t* de Student sont notées d'un astérisque (*).

A**B****C****D**

augmentent graduellement et sont significativement plus élevés à 19-20 semaines par rapport à ce qu'ils étaient à 12-14 semaines.

Les données densitométriques pour les pro-apoptotiques étudiés sont présentées à la Figure 17. Ces résultats indiquent que les niveaux d'expression de Bax (Figure 17A) demeurent stables au cours du développement entre 12-14 semaines et 19-20 semaines malgré une légère diminution non significative de 12 à 20 semaines. Les niveaux d'expression de Bak (Figure 17B) augmentent significativement et de façon graduelle entre 12-14 semaines et 19-20 semaines. Finalement, les niveaux d'expression de Bad (Figure 17C) sont élevés à 12-14 semaines et chutent à 15-16 semaines, ces niveaux d'expression demeurent très faibles de 15-16 semaines à 19-20 semaines. Globalement, on observe une diminution significative des niveaux d'expression de Bad entre 12-14 semaines et 19-20 semaines.

3.2.4 Variations segment-spécifiques de l'expression des homologues

Bcl-2 au cours du développement de l'intestin humain.

En analysant conjointement les résultats des Western blots (Figure 18), on remarque que les variations des niveaux d'expression des homologues Bcl-2 sont différentiels dans le jéjunum, l'iléon et le côlon foetal humain. En effet, l'expression relative de Bcl-2 à 19-20 semaines par rapport à 12-14 semaines diminue d'environ 53% chez le jéjunum (Figure 11A) et d'environ 36% chez l'iléon (Figure 14A), mais augmente d'environ 194% chez le côlon (Figure 16A).

Figure 17. Niveaux d'expression relatifs des homologues Bcl-2 pro-apoptotiques au cours du développement du côlon fœtal humain

Niveaux d'expression relatifs de Bax (A), Bak (B) et Bad (C) au cours du développement du jéjunum humain, en comparaison à la cytokératine 18 (K18). Les protéines totales provenant du grattage de la muqueuse ont été séparées et sondées comme présenté à la Figure 10, puis analysées par densitométrie au laser. La densité totale des points de l'aire (AU x mm) a été déterminée pour chaque protéine analysée à 10-12, 13-14, 15-16, 17-18 et 19-20 semaines de gestation (post-fertilisation), afin d'établir les profils des ratios Bax/K18 (A), Bak/K18 (B) et Bad/K18 (C). Chaque colonne représente la moyenne \pm ESM d'au moins trois différents spécimens ($n \geq 3$) analysés par stade de développement. Les différences statistiquement significatives ($0.001 \leq p \leq 0.05$) déterminées par le test *t* de Student sont notées d'un astérisque (*).

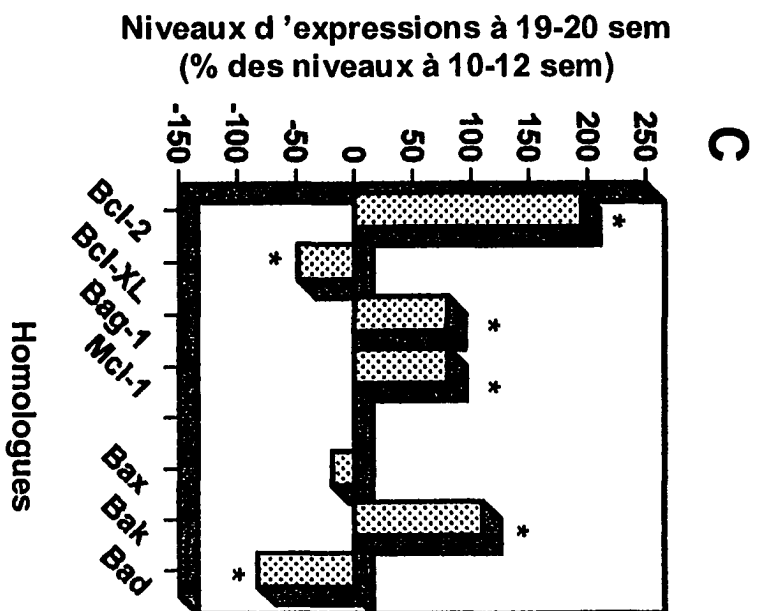
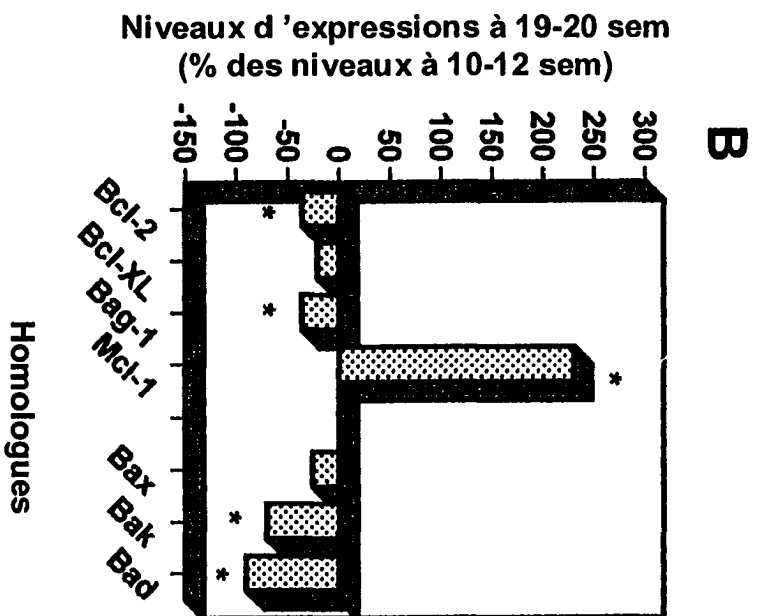
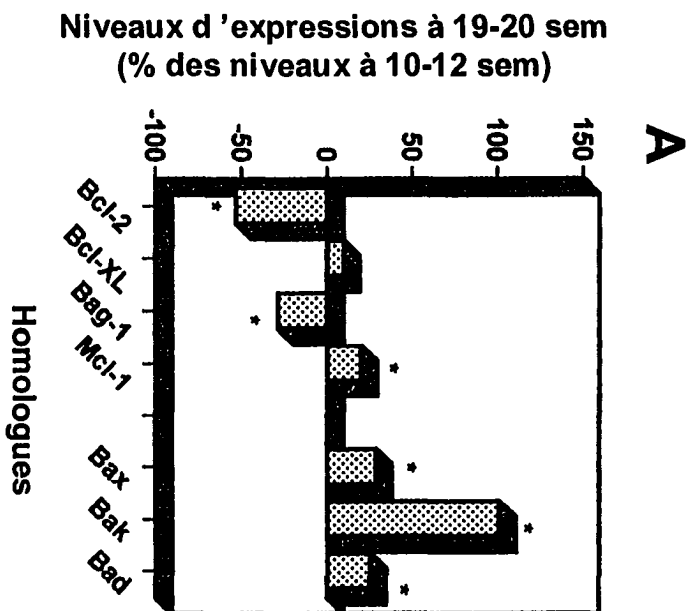
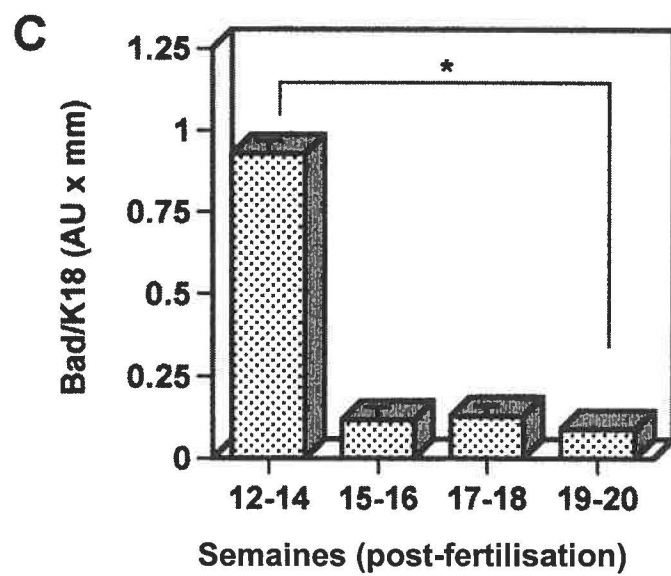
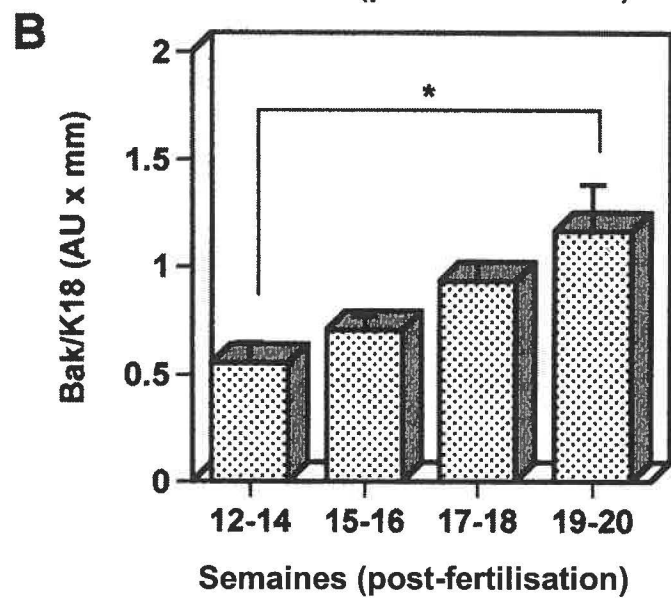
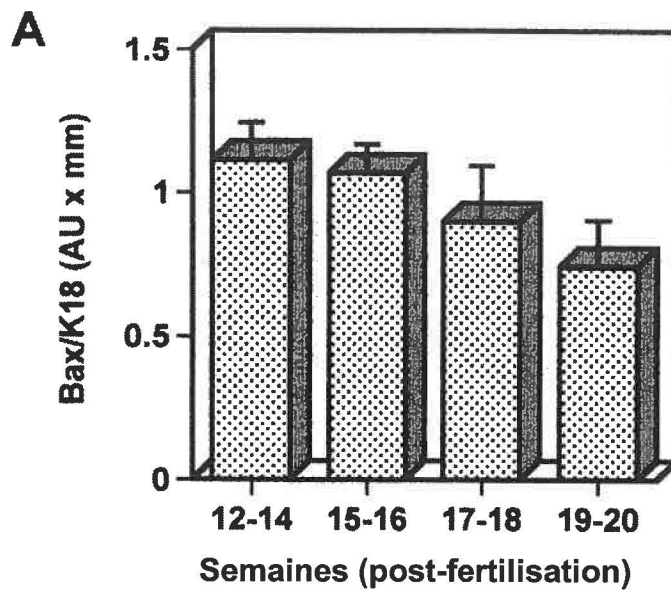


Figure 18. Variations différentielles des niveaux d'expression des homologues Bcl-2 au cours du développement du jéjunum, de l'iléon et du côlon humain

Afin d'établir l'augmentation ou la diminution relative des niveaux d'expression de Bcl-2, Bcl-X_L, Bag-1, Mcl-1, Bax, Bak et Bad, à 19-20 semaines par rapport à 10-12 semaines de gestation, les protéines totales provenant du grattage de la muqueuse du jéjunum (A), de l'iléon (B) et du côlon (C) à 10-12 et 19-20 semaines de gestation ont été séparées par SDS-15% PAGE sous conditions réductrices, électrotransférées sur des membranes de nitrocellulose puis sondées, les autoradiogrames de ces membranes ont par la suite été analysés par densitométrie au laser et la densité totale des points de l'aire (AU x mm) a été déterminée à 10-12 et 19-20 semaines de gestation. Les valeurs sont exprimées en "pourcentage du niveau à 10-12 semaine" où "0%" indique aucune différence entre les niveaux d'expression à 19-20 semaines par rapport à 10-12 semaines de gestation. Chaque colonne représente la moyenne \pm ESM d'au moins six différents spécimens (i.e. $n \geq 3$ à 10-12 semaines, $n \geq 3$ à 19-20 semaines). Les différences statistiquement significatives ($0.001 \leq p \leq 0.05$) déterminées par le test *t* de Student sont notées par un astérisque (*).



L'expression relative de Bcl-X_L ne varie pas significativement chez le jéjunum et l'iléon (Figures 11B et 14B) mais diminue d'environ 48% chez le côlon (Figure 16B). L'expression relative de Bag-1 diminue d'environ 30% chez le jéjunum (Figure 11C) et d'environ 36% chez l'iléon (Figure 14C), mais augmente d'environ 79% chez le côlon (Figure 16C). L'expression relative de Mcl-1 augmente d'environ 20% chez le jéjunum (Figure 11D), d'environ 230% chez l'iléon (Figure 14D) et d'environ 80% chez le côlon (Figure 16D).

L'expression relative de Bax augmente d'environ 30% chez le jéjunum (Figure 12A), mais ne varie pas significativement chez l'iléon et le côlon (Figures 15A et 17A). L'expression relative de Bak augmente d'environ 100% chez le jéjunum (Figure 12B), diminue d'environ 70% chez l'iléon (Figure 15B) et augmente d'environ 110% chez le côlon (Figure 17B). Finalement, l'expression relative de Bad augmente d'environ 25% chez le jéjunum (Figure 12C) mais diminue d'environ 90% chez l'iléon (Figure 15C) et 83% chez le côlon (Figure 17C).

IV. DISCUSSION

Mes travaux visaient dans un premier temps, à analyser l'expression épithéliale des homologues Bcl-2 le long de l'axe crypte villosité au cours du développement du jéjunum, de l'iléon et du côlon fœtal humain.

En observant les résultats d'immunofluorescence chez le jéjunum, l'iléon et le côlon, on remarque que pour ces trois segments les homologues Bcl-2 possèdent des patrons d'expression épithéliaux qui leur sont propre le long de l'axe crypte-villosité. On remarque également que ces patrons d'expression s'établissent tôt au cours de la vie fœtale humaine et parallèlement au développement de la muqueuse intestinale. En effet, on voit que de 9 à 14 semaines de gestation, stade qui correspond à la formation des villosités de la paroi intestinale et l'épithélium se trouve déjà simple cylindrique (Ménard, 1989; Ménard et Beaulieu, 1994; Beaulieu, 1997), tous les homologues sont présents dans tout l'épithélium. Ce n'est qu'à partir de 15 à 17 semaines de gestation, stade de développement qui correspond à la formation des cryptes de la paroi intestinale (Ménard, 1989; Ménard et Beaulieu, 1994; Beaulieu, 1997), qu'une certaine compartimentalisation se dessine. Par exemple, chez le jéjunum, Bcl-2 est concentré au niveau des cryptes en formation et Mcl-1 est fortement exprimé dans les villosités mais l'est plus faiblement dans les cryptes en formation. À 18-20 semaines de gestation, stade de développement correspondant à la maturation des cryptes et des villosités où la muqueuse

intestinale ressemble structurellement et fonctionnellement à celle de l'intestin grêle adulte (Ménard, 1989; Ménard et Beaulieu, 1994; Beaulieu, 1997), la compartimentalisation est bien établie et les patrons d'expression le long de l'axe crypte-villosité sont clairement visibles. Par exemple, Mcl-1 est fortement exprimé au niveau des villosités et à l'apex mais est absent des cryptes chez le jéjunum; Bcl-X_L présente un gradient d'expression crypte-villosité décroissant chez l'iléon; Bak forme également un gradient d'expression crypte-villosité décroissant chez le côlon.

Chez le jéjunum, nos observations pour l'expression de Bcl-2, Bcl-X_L, Bak, et Mcl-1 à mi-gestation, sont en accord avec celles précédemment rapportées chez des spécimens au troisième trimestre de gestation et/ou adulte (Hockenbery et al., 1991; Lebrun et al., 1993; Lu et al., 1993; Krajewski et al., 1994c, 1995, 1996). Aussi, aucune observation n'a été rapportée avant celles présentées ici pour l'expression de Bag-1, Bax et Bad dans le jéjunum humain. Chez l'iléon, les patrons d'expression exprimés à la mi-gestation sont également en accord avec les observations précédentes effectuées sur des spécimens d'iléon fœtal (LeBrun et al., 1993; Lu et al., 1993) et adulte (Hockenbery et al., 1991; Lu et al., 1993; Krajewski et al., 1994c, 1995, 1996; Moss et al., 1996). Toutefois, l'expression épithéliale de Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1, Bax et Bak au niveau du côlon à la mi-gestation diffère des observations effectuées chez l'adulte. Par exemple, Bcl-2 est exprimé dans tout l'épithélium du côlon à 18-20 semaines de gestation tandis que son expression suit un gradient décroissant crypte-surface chez l'adulte (Lu et al., 1993; Krajewski et

al., 1995; Krajewska et al., 1996). De même, l'expression épithéliale de Bak forme un gradient décroissant crypte-villosité à la mi-gestation, tandis que chez l'adulte cette expression se trouve restreinte au niveau de la moitié supérieure de la crypte et de l'épithélium de surface. Ces différences d'expression entre l'adulte et la mi-gestation en ce qui concerne le côlon, suggèrent que des changements supplémentaires dans le profil d'expression des homologues Bcl-2 et des mécanismes de régulation de l'apoptose se produisent après la mi-gestation pour acquérir sa morphologie adulte, et ceci en parallèle à sa perte de villosités.

L'axe crypte-villosité constitue un bon modèle de compartimentalisation vectoriel des populations de cellules prolifératives/indifférenciées (cryptes) et différenciées (villosités) dans un même tissu (Leblond 1981; Jones et Gores, 1997; Potten, 1997). Un tel "gradient" de différenciation cellulaire est, de plus, défini par les propriétés fonctionnelles des cellules pleinement différenciées des villosités, qui les distinguent des cellules des cryptes (Ménard et Beaulieu, 1994; Potten, 1997; Beaulieu, 1999; Pageot et al, 2000). Malgré que le moyen prédominant de se débarrasser des entérocytes différenciés surannés s'effectue via l'apoptose et le relâchement dans la lumière intestinale à l'apex de la villosité, l'apoptose "spontanée" des cellules des cryptes est un processus beaucoup moins fréquent qui sert à éliminer les cellules souches défectueuses et/ou endommagées (Potten, 1992; Moss et Holt, 1996; Jones et Gores, 1997; Potten, 1997). Ceci suggère qu'une compartimentalisation le long de l'axe crypte villosité des propriétés de la survie cellulaire est possible

(Potten, 1992; Moss et Holt, 1996; Jones et Gores, 1997; Potten, 1997). Pour supporter ceci, des études ont constamment rapporté une augmentation dramatique de l'apoptose des cellules des cryptes, mais peu ou pas d'augmentation de l'apoptose des cellules des villosités, après irradiation ou exposition à des drogues chimiothérapeutiques (Potten, 1992; Hall et al., 1994; Merritt et al., 1995; Potten, 1997; Pritchard et al., 1999). De plus, certains homologues Bcl-2 ont été observés individuellement et montraient des gradients d'expression le long de l'axe crypte-villosité, suggérant un rôle pour ces régulateurs apoptotiques dans la mort cellulaire programmée des cellules épithéliales intestinales (Hockenbery et al., 1991; LeBrun et al., 1995; Krajewski et al., 1996; Wilson et Potten, 1996; Aschoff et al., 1999). Nos résultats, qui analysaient six homologues à la fois, illustrent clairement un patron différentiel d'expression épithéliale dans le jéjunum, l'iléon et le côlon, où les cellules prolifératives/indifférenciées montrent un profil d'expression des homologues Bcl-2 qui est différent de celui observé dans les cellules différenciées des villosités. À cet effet, des analyses de l'apoptose entérocytaire dans des souris *knockout* $bcl-2^{-/-}$ et $bax^{-/-}$ ont rapporté des conséquences différentes entre les cellules des cryptes et celles des villosités au niveau de la résistance et/ou de la susceptibilité à l'apoptose après irradiation (Wilson et Potten, 1996; Potten, 1997; Pritchard et al., 1999). Aussi, Bag-1, une protéine connue pour s'associer à Bcl-2 et participer dans les voies de signalisations promouvant la survie cellulaire (Wang et al., 1994; Takayama et al., 1995; Gajewski et Thompson, 1996; Reed et al., 1996a,b; Wang et al., 1996; Packham et al., 1997; Adams et Cory, 1998), présente selon nos résultats un gradient

d'expression épithélial décroissant de la base des cryptes à l'apex des villosités chez le jéjunum et l'iléon. Conséquemment, ces données mises ensemble supportent fortement le concept que la survie et l'apoptose des cellules épithéliales intestinales pourrait être régulée différemment selon leur état de différenciation. Faisant suite à nos travaux présentés dans ce mémoire, il a été effectivement démontré dans notre laboratoire que la survie de l'épithélium intestinal humain est régulée via des mécanismes qui sont spécifiques au stade de différenciation (Gauthier et al.2001a).

Mes travaux visaient dans un deuxième temps à analyser les niveaux d'expression des homologues Bcl-2 au cours du développement du jéjunum, de l'iléon et du côlon foetal humain.

En observant les résultats des Western blots chez le jéjunum, l'iléon et le côlon, on remarque que pour ces trois segments, les niveaux d'expression épithéliaux des homologues Bcl-2 varient au cours du développement. Ces variations semblent survenir en fonction de l'établissement de l'axe crypte-villosité et en réponse à la compartimentalisation observée. Par exemple, les niveaux d'expression de Bcl-2 chez le jéjunum diminuent lors du développement à partir de 15-16 semaines de gestation (stade de cryptogénèse) et demeurent faibles jusqu'à 19-20 semaines. Cette diminution des niveaux d'expression de Bcl-2 peut être associée à la compartimentalisation de Bcl-2 qui se confine au niveau des cryptes chez le jéjunum.

Des études précédentes chez les rongeurs (Krajewski et al., 1994a-c; 1995, 1996; Meritt et al., 1995; Wilson et Potten, 1996; Hirose et al., 1997; Aschoff et al., 1999; Pritchard et al., 1999) et chez l'humain (Hockenbery et al., 1991; LeBrun et al., 1993; Lu et al., 1993, Hague et al., 1994; Krajewski et al., 1994c, 1995, 1996; Moss et al., 1996; Wilson et al., 2000) ont montré des différences d'expression des homologues Bcl-2 entre l'intestin grêle et le côlon. Nos analyses présentées ici fournissent une documentation accrue sur les patrons spécifiques aux segments de localisation et d'expression épithéliale des homologues Bcl-2 de l'intestin. De plus, nos résultats montrent que l'expression des homologues Bcl-2 est modulée différemment au cours du développement de l'intestin, menant à l'établissement à la mi-gestation de profils d'expression épithéliaux des homologues Bcl-2 distincts entre les segments. Parce que les homologues Bcl-2 constituent un point de vérification critique dans la régulation de l'apoptose, il a été suggéré que des profils d'expression entérocytaires différentiels pourraient refléter l'existence de contrôles de l'apoptose entérocytaire spécifiques aux segments (Potten, 1992; 1997; Jones et Gores, 1997). De plus, la balance des homologues Bcl-2 pro-versus anti-apoptotiques, ainsi que leurs activités, déterminent en grande partie comment les cellules répondent aux signaux de mort et/ou de survie (Gajewski et Thompson, 1996; Reed et al., 1996a; Adams et Cory, 1998; Evan et Littlewood, 1998; Saini et Walker, 1998). À cet effet, les observations chez les rongeurs montrant que les cellules de l'intestin grêle sont plus sensibles à l'apoptose induite par des drogues chimiothérapeutiques ou par irradiations que les cellules du côlon (Hall et al., 1994; Kiefer et al., 1995; Merritt et al., 1995; Hirose et al., 1997; Pritchard

et al., 1999) renforcent l'hypothèse que des différences dans l'expression des homologues Bcl-2 corréleraient avec des mécanismes de contrôle de l'apoptose distincts pour les segments de l'intestin (Potten, 1992, 1997; Jones et Gores, 1997). Faisant suite à nos travaux présentés dans ce mémoire, il a été effectivement démontré que la survie cellulaire intestinale humaine est caractérisée par une susceptibilité à l'apoptose spécifique aux segments, qui est à son tour liée à une distinction segmentaire dans l'implication des voies de signalisation et de régulation de l'expression des homologues Bcl-2. Donc ceci indique que la survie cellulaire est soumise à des mécanismes de contrôle spécifiques aux segments le long de l'axe proximo-distal de l'intestin (Gauthier et al., 2001b). On pense que le besoin d'avoir une distinction spécifique aux segments pour la survie cellulaire est relié à la nature du contenu luminal auquel l'épithélium intestinal est exposé le long de l'axe proximo-distal. En effet, l'épithélium du côlon est exposé à un environnement plus pro-apoptotique (c'est à dire que plusieurs composantes du fluide luminal du côlon sont des inducteurs d'apoptose incluant le butyrate et les antagonistes de la protéine kinase C, comme le diacylglycérol et les sels biliaires luminaux) que celui de l'intestin grêle et ceci requièrerait une résistance plus importante à l'apoptose (Binder et al., 1991; Cobb et Williamson, 1991; Potten, 1992, 1997; Jones et Gores, 1997; Liu et al., 1999). Conséquemment, ces données mises ensemble suggèrent que les mécanismes de contrôle de l'apoptose entérocytaire spécifique aux segments sont acquis tôt durant l'âge foetal humain.

En conclusion, les observations faites ici apportent de nouvelles perspectives dans l'établissement développemental des mécanismes de contrôle de l'apoptose entérocytaire spécifique aux segments de l'intestin humain; où l'expression des homologues Bcl-2 est modulée différemment afin d'établir, à mi-gestation, des patrons de localisation et d'expression épithéliales différents entre les segments de l'intestin. Le processus développemental responsable de l'acquisition précoce d'une distinction entre les segments pour l'expression des homologues Bcl-2 chez l'humain reste à être élucidé. Par exemple, est-ce que les patrons différentiels de localisation de certains homologues étudiés ici reflètent des fonctions différentes, pour ces mêmes homologues, dans le contrôle de l'apoptose et/ou de la survie des cellules épithéliales dans les différents segments de l'intestin? D'autres analyses utilisant des modèles *in vitro* (lignées cellulaires, culture d'explants) devront être effectuées afin de disséquer au niveau moléculaire les mécanismes qui influencent les fonctions des homologues Bcl-2 dans les cellules épithéliales, incluant leur patron d'homo-/hétérodimérisation le long de l'axe crypte villosité, ainsi que d'identifier les rôles exacts que jouent les homologues Bcl-2 eux-mêmes dans l'apoptose épithéliale et dans la pathogenèse des désordres impliquant un dérèglement de l'apoptose.

V. REMERCIEMENTS

Je voudrais tout d'abord remercier mon directeur de recherche Pierre Vachon qui au départ a cru en moi et m'a permis de réaliser ces travaux.

Je voudrais remercier également Anne Vézina pour son aide inestimable au laboratoire.

Merci aussi aux complices de lab Pat, Rem et Charlène, qui ont su animer le lab et lui donner une atmosphère de travail des plus agréables.

Merci à tous les Professeur(e)s du département pour votre appui et votre enseignement. Merci à Jean-françois Beaulieu pour les tissus et les instruments, à Daniel Ménard pour les tissus et à Nathalie Rivard pour la révision de mon mémoire. Merci également au Dr Lehoux pour la révision de mon mémoire.

Merci à ma famille qui m'a toujours encouragé. Et à May qui a été d'une grande aide et des plus patiente ;).

VI. RÉFÉRENCES

- Adams JM, Cory S, 1998. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281:1322-1326.
- Ahnen DJ, 1991. Etiology of large bowel cancer. In: The large intestine: Physiology, pathophysiology and disease. Pemberton JH Phillips SF and Shorter RG (eds). Raven Press. New York. Pp 501-520.
- Antonsson B, Martinou JC, 2000. The Bcl-2 protein family. *Exp. Cell Res* 256:50-57.
- Aschoff AP, Ott U, Funfstuck R, Stein G, Jirikowski GF, 1999. Colocalization of BAX and BCL-2 in small intestine and kidney biopsies with different degrees of DNA fragmentation. *Cell Tissue Res* 296:351-357.
- Barkla DH, Gibson PR, 1999. The fate of epithelial cells in the human large intestine. *Pathology* 31:230-238.
- Beaulieu JF, 1997. Extracellular matrix components and integrins in relationship to human intestinal epithelial cell differentiation. *Prog Histochem Cytochem* 31:1-78.
- Beaulieu JF, Vachon PH, 1994. Reciprocal expression of laminin A-chain isoforms along the crypt-villus axis in the human small intestine. *Gastroenterology* 106:829-839.
- Bedi A, Pasricha PJ, Akhtar AJ, Barber JP, Bedi GC, Giardiello FM, Zehnbaue BA, Hamilton SR, Jones RJ, 1995. Inhibition of apoptosis during development of colorectal cancer. *Cancer Res* 55:1811-1816.
- Binder HJ, Sandle GI, Rajendran V, 1991. Colonic fluid and electrolyte transport in health and disease. In: The large intestine: Physiology, pathophysiology and disease. Pemberton JH Phillips SF and Shorter RG (eds). Raven Press. New York. Pp 141-168.
- Bingle CD, Craig RW, Swales BM, Singleton V, Zhou P, Whyte MKB, 2000. Exon skipping in Mcl-1 results in a Bcl-2 homology domain 3 only gene product that promotes cell death. *J Biol Chem* 275:22136-22146.
- Boise LH, González-García M, Postema CE, Ding L, Lindsten T, Turka LA, Mao X, Nuñez G, Thompson CB, 1993. Bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 74:597-608.

Bosari S, Moneghini L, Graziani D, Lee AK, Murray JJ, Coggi G, Viale G, 1995. Bcl-2 oncoprotein in colorectal hyperplastic polyps, adenomas, and adenocarcinomas. *Hum Pathol* 26:534-540.

Bronner MP, Culin C, Reed JC, Furth EE, 1995. The bcl-2 proto-oncogene and the gastrointestinal epithelial tumor progression model. *Am J Pathol* 146:20-26.

Butler LM, Hewett PJ, Fitridge RA, Cowled PA, Aust N Z, 1999. Deregulation of apoptosis in colorectal carcinoma: theoretical and therapeutic implications. *J Surg* 69:88-94.

Cai WB, Roberts SA, Bowley E, Hendry JH, Potten CS, 1997. Differential survival of murine small and large intestinal crypts following ionizing radiation. *Int J Rad Biol* 71:145-155.

Chao DT, Korsmeyer SJ, 1998. BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu Rev Immunol* 16 395-419.

Chen CY, Faller DV, 1996. Phosphorylation of Bcl-2 protein and association with p21Ras in Ras-induced apoptosis. *J Biol Chem* 271:2376-2379.

Chen M, He HP, Zhan SX, Krajewski S, Reed JC, 2001.. Bid is cleaved by calpain to an active fragment in vitro and during myocardial ischemia/reperfusion. *J Biol Chem* 276:30724-30728.

Cheng EH, Kirsch DG, Clem RJ, Ravi R, Kastan MB, Bedi A, Ueno K, Hardwick JM, 1997. Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science* 278:1966-1968.

Ciccocioppo R, Di Sabatino A, Gasbarrini G, Corazza GR, 1999. Apoptosis and gastrointestinal tract. *It J Gastro Hepatol* 31:162-172.

Cobb RA, Williamson RCN, 1991. Embryology and developmental abnormalities of the large intestine. In: The large intestine: Physiology, pathophysiology and disease. Pemberton JH Phillips SF and Shorter RG (eds). Raven Press. New York. Pp 3-12.

Cohen JJ, 1996. Apoptosis and its regulation. *Adv Exp Med Biol* 406:11-20.

Colony PC, Neutra MR, 1983. Epithelial differentiation in the fetal rat colon. I. Plasma membrane phosphatase activities. *Dev Biol* Jun 97:349-363.

Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME, 1997. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91:231-241.

Dauça M, Bouziges F, Colin S, Keding M, Keller MK, Schilt J, Simon-Assmann P, Haffen K, 1990. Development of the vertebrate small intestine and mechanisms of cell differentiation. *Int J Dev Biol* 34:205-218.

Evan G, Littlewood T, 1998. A matter of life and cell death. *Science*. 281:1317-1322.

Farrow SN, Brown R, 1996. New members of the Bcl-2 family and their protein partners. *Curr Opin Genet Dev* 6:45-49.

Gajewski TF, Thompson CB, 1996. Apoptosis meets signal transduction: elimination of a BAD influence. *Cell* 15 87:589-592.

Gauthier R, Harnois C, Drolet JF, Reed JC, Vezina A, Vachon PH, 2001a. Human intestinal epithelial cell survival: differentiation state-specific control mechanisms. *Am J Physiol- Cell Physiol* 280:C1540-C1554.

Gauthier R, Laprise P, Cardin E, Harnois, C, Plourde A, Reed JC, Vézina A, Vachon P, 2001b. Differential sensitivity to apoptosis between the human small and large intestinal mucosae: linkage with segment-specific regulation of Bcl-2 homologs and involvement of signaling pathways. *J Cell Biochem* 82:339-355.

Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA, 1992. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 19:493-501.

Giancotti FG, 1997. Integrin signaling: specificity and control of cell survival and cell cycle progression. *Curr Opin Cell Biol* 1997 9:691-700.

Golstein P, 1997. Cell death: TRAIL and its receptors. *Curr Biol* 7:R750-R753.

Gordon JI, 1989. Intestinal epithelial differentiation: new insights from chimeric and transgenic mice. *J Cell Biol* 108:1187-1194.

Gordon JI, Hermiston ML, 1994. Differentiation and self-renewal in the mouse gastrointestinal epithelium. *Curr Opin Cell Biol* 6:795-803.

Grand RJ, Watkins JB, Torti FM, 1976. Development of the human gastrointestinal tract. A review. *Gastroenterology* 70:790-810.

Grossmann J, Mohr S, Lapentina EG, Fiocchi C, Levine AD, 1998. Sequential and rapid activation of select caspases during apoptosis of normal intestinal epithelial cells. *Am J Physiol* 274:G1117-G1124.

Hague A, Moorghen M, Hicks D, Chapman M, Paraskeva C, 1994. BCL-2 expression in human colorectal adenomas and carcinomas. *Oncogene*. 9:3367-3370.

Haldar S, Jena N, Croce CM, 1995. Inactivation of Bcl-2 by phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:4507-4511.

Hale AJ, Smith CA, Sutherland LC, Stoneman VE, Longthorne VL, Culhane AC, Williams GT, 1996. Apoptosis: molecular regulation of cell death. *Eur J Biochem* 236:1-26.

Hall PA, Coates PJ, Ansari B, Hopwood D, 1994. Regulation of cell number in the mammalian gastrointestinal tract: the importance of apoptosis. *J Cell Sci* 107:3569-3577.

Han J, Sabbatini P, Perez D, Rao L, Modha D, White E, 1996. The E1B 19K protein blocks apoptosis by interacting with and inhibiting the p53-inducible and death-promoting Bax protein. *Genes Dev* 10:461-477.

Harlow E, Lane D, 1988. Antibodies: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, chap 9.

Hirose Y, Yoshimi N, Suzui M, Kawabata K, Tanaka T, Mori H, 1997. Expression of bcl-2, bax, and bcl-XL proteins in azoxymethane-induced rat colonic adenocarcinomas. *Mol Carcinog* 19:25-30.

Hockenbery DM, Zutter M, Hickey W, Nahm M, Korsmeyer SJ, 1991. BCL2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:6961-6965.

Inohara N, Gourley TS, Carrio R, Muñiz M, Merino J, Garcia I, Koseki T, Hu Y, Chen S, Núñez G, 1998. Diva, a Bcl-2 homologue that binds directly to Apaf-1 and induces BH3-independent cell death. *J Biol Chem* 273:32479-32486.

Ito T, Deng X, Carr B, May WS, 1997. Bcl-2 phosphorylation required for anti-apoptosis function. *J Biol Chem*. 272:11671-11673.

Jacobson MD, Weil M, Raff MC, 1997. Programmed cell death in animal development. *Cell* 88:347-354.

Johnson DA, Gautsch JW, Sportsman JR, Elder JH, 1984. Improved technique utilizing non fat dry milk for analysis of proteins and nucleic acids transferred to nitrocellulose. *Gene Anal Tech* 1:3-8.

Jones BA, Gores GJ, 1997. Physiology and pathophysiology of apoptosis in epithelial cells of the liver, pancreas, and intestine. *Am J Physiol* 273:G1174-G1188.

Kagnoff MF, 1995. Coeliac disease. In: *Textbook of gastroenterology* 2nd ed. Yamada T (ed). JB Lippincott. Philadelphia. Pp1643-1661.

Kaklamanis L, Savage A, Mortensen N, Tsiotos P, Doussis-Anagnostopoulou I, Biddolph S, Whitehouse R, Harris AL, Gatter KC, 1996. Early expression of bcl-2 protein in the adenoma-carcinoma sequence of colorectal neoplasia. *J Pathol* 179:10-14.

Kiefer MC, Brauer MJ, Powers VC, Wu JJ, Umansky SR, Tomei LD, Barr PJ, 1995. Modulation of apoptosis by the widely distributed Bcl-2 homologue Bak. *Nature* 374:736-739.

Kitada S, Krajewska M, Zhang X, Scudiero D, Zapata JM, Wang HG, Shabaik A, Tudor G, Krajewski S, Myers TG, Johnson GS, Sausville EA, Reed JC, 1998. Expression and location of pro-apoptotic Bcl-2 family protein BAD in normal human tissues and tumor cell lines. *Am J Pathol* 152:51-61.

Klein RM, McKenzie JC, 1983. The role of cell renewal in the ontogeny of the intestine. I. Cell proliferation patterns in adult, fetal, and neonatal intestine. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2:10-43.

Krajewska M, Moss SF, Krajewski S, Song K, Holt PR, Reed JC, 1996. Elevated expression of Bcl-X and reduced Bak in primary colorectal adenocarcinomas. *Cancer Res* 56:2422-2427.

Krajewski S, Krajewska M, Shabaik A, Miyashita T, Wang HG, Reed JC, 1994a. Immunohistochemical determination of in vivo distribution of Bax, a dominant inhibitor of Bcl-2. *Am J Pathol* 145:1323-36.

Krajewski S, Krajewska M, Shabaik A, Wang HG, Irie S, Fong L, Reed JC, 1994b. Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of Bcl-X expression. *Cancer Res* 54:5501-5507.

Krajewski S, Krajewska M, Shabaik A, Wang HG, Irie S, Fong L, Reed JC, 1994c. Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of Bcl-X expression. *Cancer Res* 54:5501-55017.

Krajewski S, Bodrug S, Krajewska M, Shabaik A, Gascoyne R, Berean K, Reed JC, 1995. Immunohistochemical analysis of Mcl-1 protein in human tissues. Differential regulation of Mcl-1 and Bcl-2 protein production suggests a unique role for Mcl-1 in control of programmed cell death in vivo. *Am J Pathol* 146:1309-1319.

Krajewski S, Krajewska M, Reed JC, 1996. Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of Bak expression, a proapoptotic member of the Bcl-2 protein family. *Cancer Res* 56:2849-2855.

Kroemer G, Petit P, Zamzami, Vayssiere JL, Mignotte B, 1995. The biochemistry of programmed cell death. *FASEB Journal* 9:1277-1287.

Leblond CP, 1981. The life history of cells in renewing systems. *Am J Anat* 160:114-1158.

LeBrun DP, Warnke RA, Cleary ML, 1993. Expression of bcl-2 in fetal tissues suggests a role in morphogenesis. *Am J Pathol* 142:743-753.

Liu LU, Holt PR, Krivosheyev V, Moss SF, 1999. Human right and left colon differ in epithelial cell apoptosis and in expression of Bak, a pro-apoptotic Bcl-2 homologue. *Gut* 45:45-50.

Louvard D, Kedinger M, Hauri HP, 1992. The differentiating intestinal epithelial cell: establishment and maintenance of functions through interactions between cellular structures. *Annu Rev Cell Biol* 8:157-195.

Lu QL, Poulsom R, Wong L, Hanby AM, 1993. Bcl-2 expression in adult and embryonic non-haematopoietic tissues. *J Pathol* 169:431-437.

Maurer CA, Friess H, Bühler SS, Wahl BR, Graber H, Zimmermann A, Büchler MW, 1998. Apoptosis inhibiting factor Bcl-xL might be the crucial member of the Bcl-2 gene family in colorectal cancer. *Dig Dis Sci* 43:2641-2648.

Ménard D, Beaulieu JF, 1994. Human intestinal brush border membrane hydrolases. Dans G. Bakaly (Eds): *Membrane physiopathology*. Kluwer academic publisher, Norwell, MA, pp.319-341.

Ménard D, Calvert R, 1991. Fetal and post-natal development of the small and large intestine. In: T. Salom, J. Morrisset (Eds): *Growth of the gastrointestinal tract: gastrointestinal hormones and growth factors*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 147-162.

Ménard D, 1989. Organ culture studies of human gastrointestinal development. Dans M.W Smith et F.V. Sepulveda (Eds): *Adaptation and development of gastro-intestinal fonction*. Manchester University Press, Manchester et New-York, pp. 79-91.

Mendeloff AI, 1991. Limitations of epidemiologic methods in the study of colonic disorders. In: The large intestine: Physiology, pathophysiology and disease. Pemberton JH Phillips SF and Shorter RG (eds). Raven Press. New York. Pp 199-208.

Merritt AJ, Potten CS, Watson AJ, Loh DY, Nakayama K, Nakayama K, Hickman JA, 1995. Differential expression of bcl-2 in intestinal epithelia. Correlation with attenuation of apoptosis in colonic crypts and the incidence of colonic neoplasia. *J Cell Sci* 108:2261-2271.

Metcalf AD, Streuli CH, 1997. Epithelial apoptosis. *Bioessays* Aug 19:711-720.

Metcalf AD, Gilmore A, Klinowska T, Oliver J, Valentijn A, Brown R, Ross A, Macgregor G, Hickman JA, Streuli CH, 1999. Developmental regulation of Bcl-2 family protein expression in the evolving mammary gland. *J Cell Sci* 112:1771-1783.

Miyashita T, Reed JC, 1995. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80:293-299.

Moss SF, Agarwal B, Arber N, Guan RJ, Krajewska M, Krajewski S, Reed JC, Holt PR, 1996a. Increased intestinal Bak expression results in apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 223:199-203.

Moss SF, Attia L, Scholes JV, Walters JRF, Holt PR, 1996b. Increased small intestinal apoptosis in coeliac disease. *Gut* 39:811-817.

Moss SF et Holt PR, 1996. Apoptosis in the intestine. *Gastroenterology*. 111:567-568

Nakamura T, Sakai T, Nariya S, 1995. Cell death in colorectal polyps as evaluated by in situ 3'-tailing reaction and its relationship to BCL-2 expression. *Pathol Int* 45:721-8.

Ogura E, Senzaki H, Yamamoto D, Yoshida R, Takada H, Hioki K, Tsubura A, 1999. Prognostic significance of Bcl-2, Bcl-xL/S, Bax and Bak expressions in colorectal carcinomas. *Oncology Reports* 6:365-369.

Oltvai ZN, Korsmeyer SJ, 1994. Checkpoints of dueling dimers foil death wishes. *Cell* 79:189-192.

Ouyang H, Furukawa T, Abe T, Kato Y, Horii A, 1998. The BAX gene, the promoter of apoptosis, is mutated in genetically unstable cancers of the colorectum, stomach, and endometrium. *Clin Cancer Res* 4:1071-1074.

Packham G, Brimmel M, Cleaveland JL, 1997. Mammalian cells express two differently localized Bag-1 isoforms generated by alternative translation initiation. *Biochem J* 328:807-813.

Pageot LP, Perreault N, Basora N, Francoeur C, Magny P, Beaulieu JF, 2000. Human cell models to study small intestinal functions: recapitulation of the crypt-villus axis. *Microsc Res Tech* 49:394-406.

Potten CS, 1992. The significance of spontaneous and induced apoptosis in the gastrointestinal tract of mice. *Cancer & Metast Rev* 11:179-95

Potten CS, 1997. Epithelial cell growth and differentiation. II. Intestinal apoptosis. *Am J Physiol* 273:G253-G257.

Potten CS, 1998. Stem cells in gastrointestinal epithelium: numbers, characteristics and death. *Philos Trans Roy Soc Lond - Series B: Biological Sciences*. 353:821-30

Pritchard DM, Potten CS, Korsmeyer SJ, Roberts S, Hickman JA, 1999. Damage-induced apoptosis in intestinal epithelia from bcl-2-null and bax-null mice: investigations of the mechanistic determinants of epithelial apoptosis in vivo. *Oncogene* 18:7287-7293.

Quaroni A, Isselbacher KJ, 1985. Study of intestinal cell differentiation with monoclonal antibodies to intestinal cell surface components. *Dev Biol* 111:267-279.

Que F, Gores GJ, 1996. Apoptosis and the gastrointestinal system. *Adv Pharmacol* 4 : 409-428.

Reed JC, Miyashita T, Takayama S, Wang HG, Sato T, Krajewski S, Aime-Sempe C, Bodrug S, Kitada S, Hanada M, 1996a. BCL-2 family proteins: regulators of cell death involved in the pathogenesis of cancer and resistance to therapy. *J Cell Biochem* 60:23-3.

Reed JC, Zha H, Aime SC, Takayama S, Wang HG, 1996b. Structure-function analysis of Bcl-2 family proteins. Regulators of programmed cell death. *Adv. Exp. Med. Biol.* 406:99-112.

Ruoslahti E, Reed JC, 1994. Anchorage dependence, integrins, and apoptosis. *Cell* 77:477-478.

Ruvolo PP, Deng X, May WS, 2001. Phosphorylation of Bcl2 and regulation of apoptosis. *Leukemia* 15:515-522.

Saini KS, Walker NI, 1998. Biochemical and molecular mechanisms regulating apoptosis. *Mol Cell Biochem* 178:9-25.

Scheid S, Heinzinger M, Waller CF, Lange W, 1998. Bcl-2 mRNA-targeted ribozymes: effects on programmed cell death in chronic myelogenous leukemia cell lines. *Ann Hematol* 76:117-125.

Shaposhnikov Y, Maheshwari Y, Sykes DE, Weiser M, 1996. Intestinal cell apoptosis and Bcl-2 expression. *Death Diff* 3:125-120.

Shi YB, Li Q, Damjanovski S, Amano T, Ishizuyaoka A, 1998. Regulation of apoptosis during development-input from the extracellular matrix. *Int J Mol Med* 2:273-282.

Schurmann A, Mooney AF, Sanders LC, Sells MA, Wang HG, Reed JC, 2000. Bokoch GM. p21-activated kinase 1 phosphorylates the death agonist Bad and protects cells from apoptosis. *Mol Cell Biol* 20:453-461

Staunton MJ, Gaffney EF, 1998. Apoptosis: basic concepts and potential significance in human cancer. *Arch Pathol Lab Med* Apr 122:310-319.

Stenson WF 1995. Inflammatory bowel disease. In: Textbook of gastroenterology 2nd ed. Yamada T (ed). JB Lippincott. Philadelphia. Pp 1748-1806.

Sträter J, Koretz K, Günthert AR, Möller P, 1995. In situ detection of enterocytic apoptosis in normal colonic mucosa and in familial adenomatous polyposis. *Gut* 37:819-825.

Sträter J, Wedding U, Barth TF, Koretz K, Elsing C, Möller P, 1996. Rapid onset of apoptosis in vitro follows disruption of beta 1-integrin/matrix interactions in human colonic crypt cells. *Gastroenterology* 110:6 1776-1784.

Takayama S, Kochel K, Irie S, Inazawa J, Abe T, Sato T, Druck T, Huebner K, Reed JC, 1996. Cloning of cDNAs encoding the human BAG1 protein and localization of the human BAG1 gene to chromosome 9p12. *Genomics* 35:494-498.

Takayama S, Krajewski S, Krajewska M, Kitada S, Zapata JM, Kochel K, Knee D, Scudiero D, Tudor G, Miller GJ, Miyashita T, Yamada M, Reed JC, 1998. Expression and location of Hsp70/Hsc-binding anti-apoptotic protein BAG-1 and its variants in normal tissues and tumor cell lines. *Cancer Res* 58:3116-3131.

Takayama S, Sato T, Krajewski S, Kochel K, Irie S, Millan JA, Reed JC, 1995. Cloning and functional analysis of BAG-1: a novel Bcl-2-binding protein with anti-cell death activity. *Cell* 80:279-284.

Vachon PH, Perreault N, Magny P, Beaulieu JF, 1996. Uncoordinated, transient mosaic patterns of intestinal hydrolase expression in differentiating human enterocytes. *J Cell Physiol* 166:198-207.

Vachon PH, Cardin E, Harnois C, Reed JC, Vézina A. 2000. Early establishment of epithelial apoptosis in the developing human small intestine. *Int.J.Dev.Biol* 44:891-898

Vaux DL, Korsmeyer SJ, 1999. Cell death in development. *Cell* 96:245-254.

Vaux DL, Strasser A, 1996. The molecular biology of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:2239-2244.

Wang HG, Miyashita T, Takayama S, Sato T, Torigoe T, Krajewski S, Tanaka S, Hovey III L, Troppmair J, Rapp UR, Reed JC. 1994. Apoptosis regulation by interaction of Bcl-2 protein and Raf-1 kinase. *Oncogene* 9:2751-2756.

Wang HG, Reed JC, 1998. Mechanisms of Bcl-2 protein function. *Histol Histopathol* 13:521-530.

Wang HG, Takayama S, Rapp UR, Reed JC, 1996. Bcl-2 interacting protein, BAG-1, binds to and activates the kinase Raf-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:7063-7068.

Watson AJM, Merritt AJ, Jones LS, Askew JN, Anderson E, Becciolini A, Balzi M, Potten CS, Hickman JA, 1996. Evidence for reciprocity of bcl-2 and p53 expression in human colorectal adenomas and carcinomas. *Br J Cancer* 73:889-895.

Wilson JW, Nostro MC, Balzi M, Faraoni P, Cianchi F, Becciolini A, Potten CS, 2000. Bcl-w expression in colorectal adenocarcinoma. *Br J Cancer* 82:178-185.

Wilson JW, Potten CS 1996. Immunohistochemical localization of Bax and Bad in the normal and Bcl-2-null gastrointestinal tract. *Apoptosis* 1:183-190.

Wyllie A, 1998. Apoptosis: An endonuclease at last. *Nature* 391:20-21.

Wyllie AH, 1997. Apoptosis: an overview. *Br Med Bull* 53:451-465.

Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR, 1980. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68 251-306.

Yagi OK, Akiyama Y, Nomizu T, Iwama T, Endo M, Yuasa Y, 1998. Proapoptotic gene BAX is frequently mutated in hereditary nonpolyposis colorectal cancers but not in adenomas. *Gastroenterology* 114:268-274.

Yamamoto H, Sawai H, Weber TK, Rodriguezbigas MA, Perucho M, 1998. Somatic frameshift mutations in DNA mismatch repair and proapoptosis genes in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer Research* 58:997-1003.

Zamzami N, Brenner C, Marzo I, Susin SA, Kroemer G, 1998. Subcellular and submitochondrial mode of action of Bcl-2-like oncoproteins. *Oncogene* 16:2265-2282.

Zushi S, Shinomura Y, Kiyohara T, Miyazaki Y, Tsutsui S, Sugimachi M, Higashimoto Y, Kanayama S, Matsuzawa Y, 1997. Role of heparin-binding EGF-related peptides in proliferation and apoptosis of activated ras-stimulated intestinal epithelial cells. *Int J Cancer* 1997 73:917-923.